

In compliance with the  
Canadian Privacy Legislation  
some supporting forms  
may have been removed from  
this dissertation.

While these forms may be included  
in the document page count,  
their removal does not represent  
any loss of content from the dissertation.



**Université de Sherbrooke**

**Analyse de l'expression des gènes *Hox* du groupe B  
chez des souris transgéniques présentant des  
altérations dans l'expression des diverses isoformes de  
RAR $\beta$ .**

**Par  
Christian Bellehumeur**

**Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) en  
Biologie Cellulaire**

**Mars 2003**



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitons et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 0-612-86632-7*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 0-612-86632-7*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

**Canada**

## RÉSUMÉ

Analyse de l'expression des gènes *Hox* du groupe B chez des souris transgéniques présentant des altérations dans l'expression des diverses isoformes de RAR $\beta$ .

Christian Bellehumeur  
Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine,  
Université de Sherbrooke.

Les gènes homéotiques de type *Hox* sont reconnus pour jouer un rôle important dans le développement embryonnaire mais ils sont maintenant aussi reconnus pour jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose chez l'adulte. Lorsque ces gènes homéotiques sont exprimés de façon aberrantes, ils peuvent être tumorigènes. Par exemple, ils peuvent causer des leucémies. De plus, des expressions aberrantes des gènes *Hox* ont été relevées dans différents types de cancers comme les cancers du poumon, du colon, du sein et des reins ce qui suggère qu'ils puissent aussi jouer un rôle dans ces cancers. Nous savons aussi que certains de ces gènes sont directement contrôlés par l'acide rétinoïque via les récepteurs RAR et RXR. Divers modèles de souris transgéniques sous-exprimant différents isoformes de RAR $\beta$  ont été mis au point par l'équipe de recherche du Dr. Jacques Bérard. Ces souris, lorsqu'elles sont âgées de plus de 10 mois, sont très susceptibles au développement de tumeurs pulmonaires. Nous avons vérifié, chez ces souris transgéniques, l'expression des gènes *Hox* du groupe B et nous avons remarqué que l'expression de plusieurs de ces gènes, dont *Hoxb-2*, *Hoxb-3* et *Hoxb-4*, est fortement affectée au niveau des poumons.

Le rôle de ces gènes *Hox* dans le processus de tumorigenèse pulmonaire est encore inconnu, mais nous soupçonnons que certains de ces gènes puissent avoir des effets pro-tumoraux tandis que d'autres des effets anti-tumoraux. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons mis au point une technique de séparation et de purification de pneumocytes de type II que nous utiliserons à plusieurs fins dans de futurs projets.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le système pulmonaire.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Les cancers pulmonaires.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1 Introduction. ....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2 Les types de cancers pulmonaires.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2.1 Les SCLC. ....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2.2 Les NSCLC.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2.3 Les autres types de cancers pulmonaires. ....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.3 La génétique des cancers pulmonaires. ....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Le récepteur à l'acide rétinoïque bêta: gène candidat impliqué dans     les cancers pulmonaires.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1 Introduction. ....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2 La famille des récepteurs nucléaires répondant à l'acide rétinoïque. ....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.3 Convergence des voies de signalisation.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.4 Les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires répondant       à l'acide rétinoïque.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.4.1 Les domaines modulateurs A et B.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.4.2 Le domaine de liaison à l'ADN.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.4.3 Le domaine charnière.....</b>	<b>30</b>

1.3.4.4	Le domaine de liaison du ligand et le domaine F.....	31
1.3.5	Implication de RAR $\beta$ dans les cancers pulmonaires.....	32
1.4	Les gènes à homéodomaines de la famille <i>hom/hox</i> .....	36
1.4.1	Introduction. ....	366
1.4.2.	Structures des protéines Hox.....	37
1.4.3	Distribution des gènes <i>Hox</i> dans le génome et leur expression dans l'embryon.....	40
1.4.4	Régulation des gènes <i>Hox</i> . ....	44
1.4.5	Rôles des gènes <i>Hox</i> au stade adulte. ....	47
1.4.6	Implication des gènes <i>Hox</i> dans la tumorigenèse. ....	48
2.	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL. ....	51
3.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	54
3.1	Modèles animaux. ....	55
3.2	Identification des souris transgéniques .....	58
3.3	Évaluations histologiques des poumons de souris .....	59
3.4	Immunofluorescence .....	61
3.5	Statistiques sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence.....	64
3.6	Statistiques sur le signal nucléo-cytoplasmique.....	65
3.7	Purification et mise en culture des pneumocytes de type II .....	65
3.8	Analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II purifiés .....	68
3.9	Analyse de la distribution des pneumocytes de type II dans le cycle cellulaire.....	70
4.	RÉSULTATS .....	72
4.1	Présence de tumeurs chez les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et AS-RAR $\beta$ 4-like .....	73



<b>4.2</b>	<b>Comparaison de l'expression des protéines Hox entre les pneumocytes de type II, les cellules de Clara et les cellules cancéreuses chez des modèles de souris transgéniques AS-RAR<math>\beta</math>1/<math>\beta</math>3, AS-RAR<math>\beta</math>2 et RAR<math>\beta</math>4-like et des souris témoins.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Expression de la protéine Hoxb-2 dans les poumons des souris transgéniques et témoins .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Expression de la protéine Hoxb-3 dans les poumons des souris transgéniques et témoins .....</b>	<b>99</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Expression de la protéine Hoxb-4 dans les poumons des souris transgéniques et témoins .....</b>	<b>124</b>
<b>4.3</b>	<b>Analyse de l'homogénéité de pneumocytes de type II purifié à partir des poumons de souris.....</b>	<b>141</b>
<b>4.4</b>	<b>Analyse de la distribution des pneumocytes de type II dans le cycle cellulaire.....</b>	<b>141</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>168</b>
<b>7</b>	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>171</b>
<b>8</b>	<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>172</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Incidence d'apparition des tumeurs pulmonaires chez les souris témoins et les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.....	80
<b>Tableau 2:</b> Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.....	86
<b>Tableau 3:</b> Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris témoins.....	91
<b>Tableau 4:</b> Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like et les souris témoins.....	97
<b>Tableau 5:</b> Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.....	102
<b>Tableau 6 :</b> Statistique sur la distribution du signal nucléo-cytoplasmique au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.....	108
<b>Tableau 7 :</b> Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris témoins.....	113
<b>Tableau 8 :</b> Statistique sur la distribution du signal nucléo-cytoplasmique au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris contrôles.....	117

<b>Tableau 9</b> : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like et les souris témoins.....	122
<b>Tableau 10</b> : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.....	128
<b>Tableau 11</b> : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris témoins.....	133
<b>Tableau 12</b> : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like et les souris témoins.....	138
<b>Tableau 13</b> : Analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II purifiés des poumons d'une souris témoin.....	144
<b>Tableau 14</b> : Analyse de la distribution des pneumocytes de type II provenant de souris transgéniques ou témoins dans le cycle cellulaire.....	149

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Le système pulmonaire.....	3
<b>Figure 2:</b> Hypothèse sur l'origine cellulaire des cancers pulmonaires chez l'humain...10	10
<b>Figure 3:</b> Isoformes des deux familles de récepteurs de l'acide rétinoïque.....	18
<b>Figure 4:</b> Agencement des demi-sites consensus dans les RARE.....	22
<b>Figure 5:</b> Les domaines fonctionnels des récepteurs à l'acide rétinoïque.....	27
<b>Figure 6:</b> Les domaines fonctionnels des protéines Hox.....	38
<b>Figure 7:</b> Localisation et organisation génique des gènes <i>Hox</i> chez les mammifères....	42
<b>Figure 8:</b> Régulation transcriptionnelle des gènes <i>Hox</i> . Exemple de la régulation de <i>Hoxb-1</i> .....	45
<b>Figure 9:</b> Description des transgènes contenus dans les modèles animaux AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.....	56
<b>Figure 10:</b> Identification des souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 ou RAR $\beta$ 4-like.....	74
<b>Figure 11:</b> Examen histologique des poumons provenant de souris témoins ou transgéniques présentant une altération de l'expression des isoformes de RAR $\beta$ . .....	77
<b>Figure 12:</b> Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3.....	84
<b>Figure 13:</b> Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 2.....	89
<b>Figure 14:</b> Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques RAR $\beta$ 4-like.....	95
<b>Figure 15:</b> Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3.....	100
<b>Figure 16:</b> Exemples de co-localisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 avec le marqueur nucléaire Bobo3.....	106

- Figure 17:** Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 2.....111
- Figure 18:** Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques RAR $\beta$ 4-like.....120
- Figure 19:** Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-AR $\beta$ 1/ $\beta$ 3.....126
- Figure 20:** Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 2.....131
- Figure 21:** Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques RAR $\beta$ 4-like.....136
- Figure 22:** Analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II extraits et purifiés de poumons d'une souris témoin.....142
- Figure 23:** Distribution des pneumocytes de type II provenant de souris transgéniques ou témoins dans le cycle cellulaire.....147

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

°C	Degré Celcius
ADN	Acide désoxyribonucléique
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
ARMm	ARN messenger
AS	antisens
BSA	Albumine de sérum bovin
dNTP	désoxynucléotides triphosphate
FBS	Sérum de bovin foetal
FITC	Fluorescéine
KDa	kilo-Dalton
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mm	millimètre
mM	Millimolaire
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
NSCLC	Cancers non-à petite cellules
NTg	Non-transgénique
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne de l'ADN polymérase
pmole	Picomole
RAR	Récepteurs à l'acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinoïque
RT-PCR	Transcription inverse sur ARN suivi d'un PCR
RXR	Récepteurs aux rétinoides
RXRE	Élément de réponse aux rétinoides
SCLC	Cancers à petites cellules
TAE	Tampon Tris, Acetate, EDTA
U	Unité
µg	Micro-gramme
µL	Microlitre
µm	Micromètre

## **1. Introduction.**

## 1.1 Le système pulmonaire.

Le système pulmonaire est une structure complexe qui remplit une fonction importante dans l'organisme humain: assurer les échanges gazeux. Ainsi, les poumons permettent, via le système cardiovasculaire, l'oxygénation nécessaire au métabolisme cellulaire. Les poumons assurent aussi l'élimination du gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), un produit métabolique libéré par les cellules (Marieb, 1993). Le système pulmonaire est composé des voies respiratoires donnant accès aux poumons, des poumons proprement dits, et des systèmes musculaires et nerveux permettant la régulation de la respiration (Figure 1; Marieb, 1993).

Les échanges gazeux se font au niveau des alvéoles qui offrent les surfaces d'échanges suffisantes pour le permettre. La multitude d'alvéoles retrouvée dans les poumons augmente largement la surface d'échange gazeux. Plusieurs types cellulaires sont retrouvés au niveau des alvéoles. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires (Figure 1; Marieb, 1993).

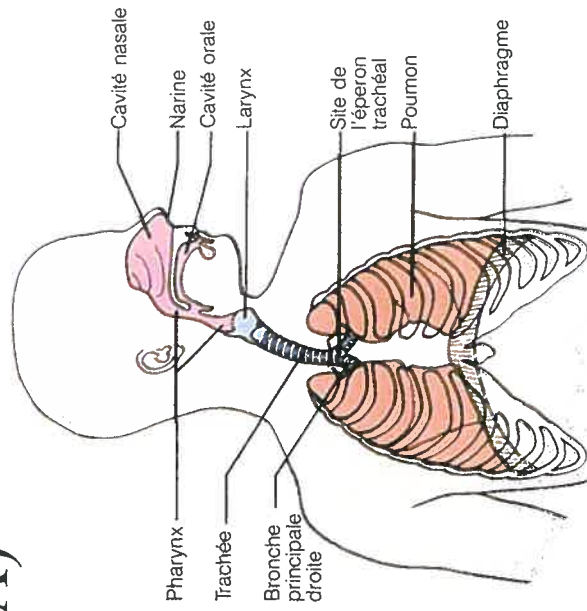
Les pneumocytes de type I, des cellules épithéliales pavimenteuses, tapissent la majorité des alvéoles. Ce sont ces cellules qui assurent les échanges gazeux. La différenciation cellulaire des pneumocytes de type I est terminale (Crestani et Aubier, 1995). Les pneumocytes de type II, plus gros que les pneumocytes de type I, adoptent une structure cuboïdale et participent peu aux échanges gazeux. Par contre, ils assurent les échanges gazeux en empêchant l'affaissement des alvéoles sur elles-mêmes par la production de surfactants qui permettent de diminuer la tension de surface (Crestani et Aubier, 1995). Les pneumocytes de type II sont des cellules différenciées de façon non-



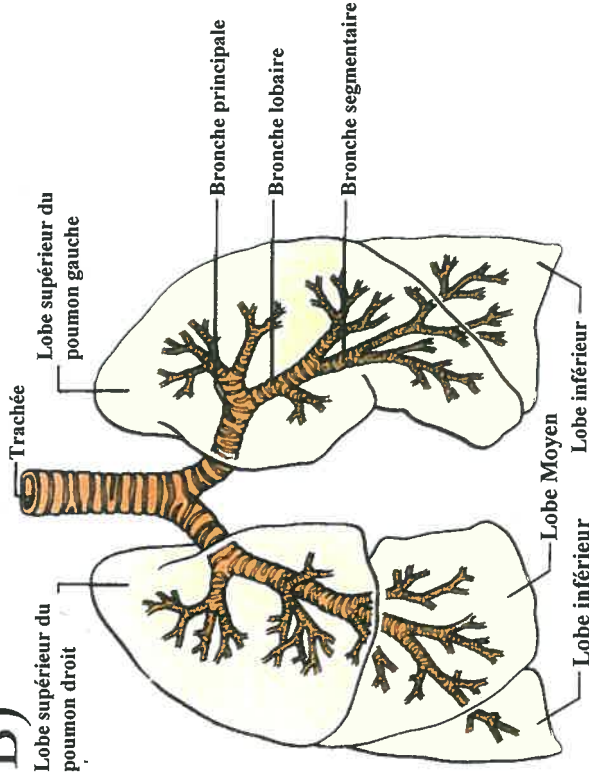
**Figure 1: Le système pulmonaire.**

Le système pulmonaire comprend dans son ensemble les voies respiratoires, les poumons, et le système musculaire et nerveux contrôlant la respiration **(A)**. Les voies respiratoires comprennent la cavité nasale, le pharynx, le larynx, la trachée et les bronches **(A)**. Les poumons sont divisés en 2 poumons (le gauche et le droit) qui sont subdivisés en 5 lobes : le lobe supérieur du poumon droit, le lobe moyen, le lobe inférieur du poumon droit, le lobe supérieur du poumon gauche et le lobe inférieur du poumon gauche. L'accès aux poumons se fait par les bronches (bronche principale) qui rapidement, au niveau des poumons, se divisent en bronches lobaires (secondaires) et bronches segmentaires (tertiaires). Finalement, les bronches segmentaires sont divisées en bronchioles qui elles-mêmes se termineront en sac alvéolaire **(B)**. Les échanges gazeux se font aux niveaux des alvéoles. Les alvéoles se composent de plusieurs types cellulaires: les pneumocytes de type I tapissant la majorité de la surface alvéolaire et qui assurent les échanges gazeux, les pneumocytes de type II qui sécrètent le surfactant qui empêchera le collapsus alvéolaire en diminuant la tension de surface et, finalement, les macrophages qui assurent l'élimination des corps étrangers ayant pu se rendre jusqu'aux alvéoles **(C)**. Finalement, le système musculaire contrôlant la respiration est composé des muscles intercostaux et du diaphragme **(A)**.

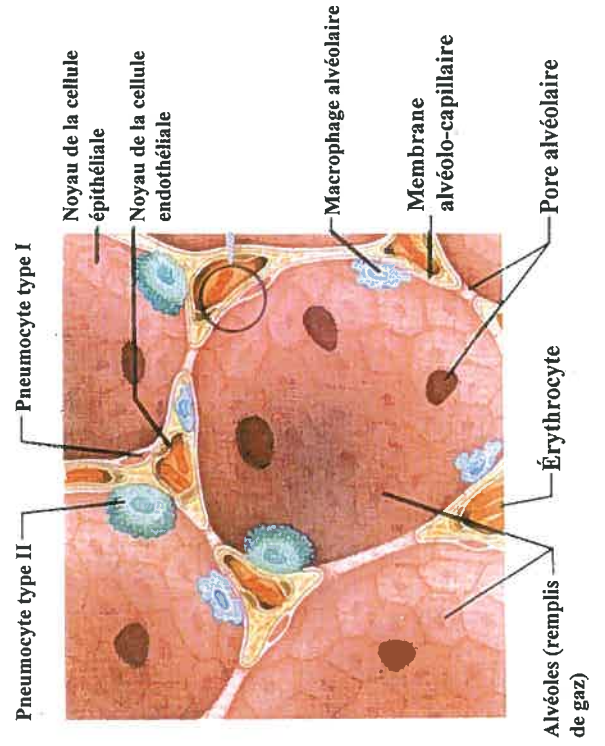
A)



B)



C)



terminale. Ainsi, s'il y a atteinte à l'intégrité tissulaire dans les alvéoles, les pneumocytes de type II participent à la régénération rapide des tissus. En effet, ces cellules ont la capacité de se différencier, de se multiplier afin de se redifférencier en pneumocytes de type I ou de type II (Crestani et Aubier, 1995).

Les macrophages se retrouvent dans la lumière des alvéoles et ont pour fonction d'éliminer les micro-organismes et les poussières qui peuvent s'y rendre. Ces macrophages, une fois leurs fonctions remplies, sont éliminés des alvéoles en suivant le courant ciliaire induit par les cellules de Clara retrouvées au niveau des bronchioles et sont transportés passivement jusqu'au pharynx (Marieb, 1993).

Le surfactant pulmonaire est produit et sécrété par deux types cellulaires dans les poumons soient les pneumocytes de type II (Crestani et Aubier, 1995) et les cellules de Clara (Mason *et al.*, 2000). Le surfactant chez l'humain est composé à 10% de protéines de surfactant (SPA, SPB, SPC et SPD) (Crestani et Aubier, 1995; Haagsman et Diemel, 2001) et à 90% d'un mélange de lipides (80.5% phosphatidylcholine, 12.3% phosphatidyléthanolamine, 9.1% phosphatidylglycérol, 7.3% cholestérol, 2.7% sphingomyéline, 2.6% phosphatidylinositol, et 0.9% phosphatidylsérine) (Veldhuizen *et al.*, 1998).

Plusieurs chercheurs ont suggéré que certains types de cancers pulmonaires ont pour origine les cellules de Clara ou les pneumocytes de type II (Thaete et Malkinson, 1991; Gazdar *et al.*, 1990).

## 1.2 Les cancers pulmonaires.

### 1.2.1 Introduction.

Les poumons, comme plusieurs autres organes, sont susceptibles au développement de cancers (Marieb, 1993). Par définition, le cancer est une pathologie caractérisée par une prolifération locale et aberrante de cellules pouvant éventuellement mener au développement de foyers secondaires dans l'organisme (métastases). À des stades cancéreux avancés, les cellules sont en prolifération cellulaire non contrôlée, moins susceptibles à l'apoptose et démontrent une perte de l'identité cellulaire.

Généralement, le développement des cancers pulmonaires est causé par une exposition prolongée à des agents cancérigènes (tabagisme, hydrocarbures, amiante, etc; Marieb, 1993; Chaturvedi et Chaturvedi, 2001). Il existe aussi d'autres facteurs de risques tels les radiations ionisantes, comme par exemple l'exposition au radon (Leenhouts et Brugmans, 2001), l'infection virale par le virus du papillome chez l'humain (Cook *et al.*, 2000) ou des mutations ponctuelles lors de la réplication de l'ADN. Le développement des cancers pulmonaires peut aussi provenir de certains caractères génétiques transmissibles et qui peuvent constituer un facteur de risques supplémentaire pour le développement des cancers pulmonaires chez la progéniture. Par exemple, les mutations du gène du rétinoblastome 1 transmissibles héréditairement sont un facteur de risque pour le développement du cancer pulmonaire (Kleinerman *et al.*, 2000).

Des expositions prolongées aux agents cancérigènes et aux radiations peuvent causer des mutations au niveau de certains gènes clés impliqués dans le contrôle de la

prolifération et de la différenciation cellulaires, le contrôle de l'apoptose et de la reconnaissance immunitaire des cellules anormales (Salgia et Skarin, 1998), de même que l'insertion d'ADN viral dans le génome peut activer ou inactiver ces mêmes gènes clés. Les cellules affectées perdent ou gagnent ainsi des capacités importantes liées au contrôle de la prolifération cellulaire, de la survie cellulaire ou de l'identité cellulaire (Salgia et Skarin, 1998). Ces cellules commencent alors à se diviser de façon anarchique. Cependant, il est important de noter qu'une seule mutation est insuffisante pour mener au développement d'un cancer pulmonaire. D'autres mutations dans plusieurs gènes clés semblent nécessaires pour compléter le processus de tumorigenèse. Ainsi, l'accumulation de mutations finira par engendrer des cellules se divisant de façon anarchique et résistant fortement à l'apoptose (Mao, 2001).

Au Canada, le cancer pulmonaire est la deuxième forme de cancer la plus souvent diagnostiquée chez l'humain, après les cancers de la prostate chez l'homme et les cancers du sein chez la femme. Par contre, les cancers pulmonaires représentent la forme de cancer la plus mortelle tant chez l'homme que chez la femme. Encore aujourd'hui, jusqu'à 90% des cancers pulmonaires diagnostiqués sont mortels dans une période de cinq ans suivant le diagnostic initial (Institut national du cancer du Canada, 2001). Il est reconnu que la cause majeure du développement des cancers pulmonaires est le tabagisme ou l'exposition secondaire à la fumée du tabac. En effet, le tabagisme est à l'origine de 85% des cas de cancers pulmonaires (Marieb, 1993). Le 15% restant surviennent suite à l'exposition à l'amiante (Chaturvedi et Chaturvedi, 2001), au radon (Leenhouts et Brugmans, 2001), à la pollution atmosphérique ou à d'autres agents cancérigènes présents en milieu de travail (Droste *et al.*, 1999). En général, chez

environ 20% des grands fumeurs, les cancers pulmonaires apparaissent 15 à 20 ans après le début du tabagisme.

### **1.2.2 Les types de cancers pulmonaires.**

Il existe plusieurs formes de cancers pulmonaires classées selon 3 groupes. Il y a la classe des « cancers non à petites cellules » (NSCLC) (Matthews et Linnoila, 1988), la classe des « cancers à petites cellules » (SCLC) (Matthews et Linnoila, 1988) et la classe des cancers apparentés aux poumons mais non classés dans les deux premiers groupes. Ce dernier groupe de cancers pulmonaires comprend les carcinoïdes bronchopulmonaires et les mésothéliomes malins (Matthews et Linnoila, 1988).

#### **1.2.2.1 Les SCLC.**

Les SCLC représentent la forme la plus agressive et la plus mortelle des cancers pulmonaires. Généralement, lors du diagnostic, les SCLC sont déjà au stade métastatique, hypothéquant gravement les chances de survie des patients. Ces cancers débutent habituellement au niveau des bronches dans la partie supérieure des poumons. Les SCLC sont reconnus comme étant des tumeurs de type neuroendocriniennes et sont caractérisées par des granules de sécrétion retrouvés dans les cellules de type neuronal (Matthews et Linnoila, 1988). Deux formes de SCLC sont présentement reconnues soit les SCLC classiques et les SCLC variants. Les SCLC classiques expriment une grande panoplie de marqueurs neuroendocriniens : présence de granules de sécrétions, présence de L-dopa décarboxylase, d'énolase neurone-spécifique, d'une isoenzyme créatine kinase du cerveau et production de peptides et d'amines hormonales comme le peptide

stimulant le relargage de la gastrin (GRP), la calcitonine, l'adrenocorticotropine, le peptide atrial natriurétique (ANP), la sérotonine, etc (Matthews et Linnoila, 1988; Linnoila, 1996). Les SCLC variants expriment seulement quelques-uns de ces marqueurs (absence de granules de sécrétions, perte de l'expression de plusieurs peptides hormonaux comme la GRP ou la calcitonine et diminution de l'expression de certains marqueurs comme l'énolase neurone spécifique) (Matthews et Linnoila, 1988; Linnoila, 1996). De plus, une forte amplification du gène c-myc a été mise en évidence dans les SCLC variants de même qu'une diminution du temps de doublement de la population cellulaire. L'origine cellulaire des SCLC est encore inconnue, bien qu'il soit soupçonné que ces cancers se développeraient à partir de cellules d'origine neuroendocriniennes (Figure 2). Les SCLC représentent quinze à vingt pourcent des cancers pulmonaires diagnostiqués chez l'humain (Matthews et Linnoila, 1988).

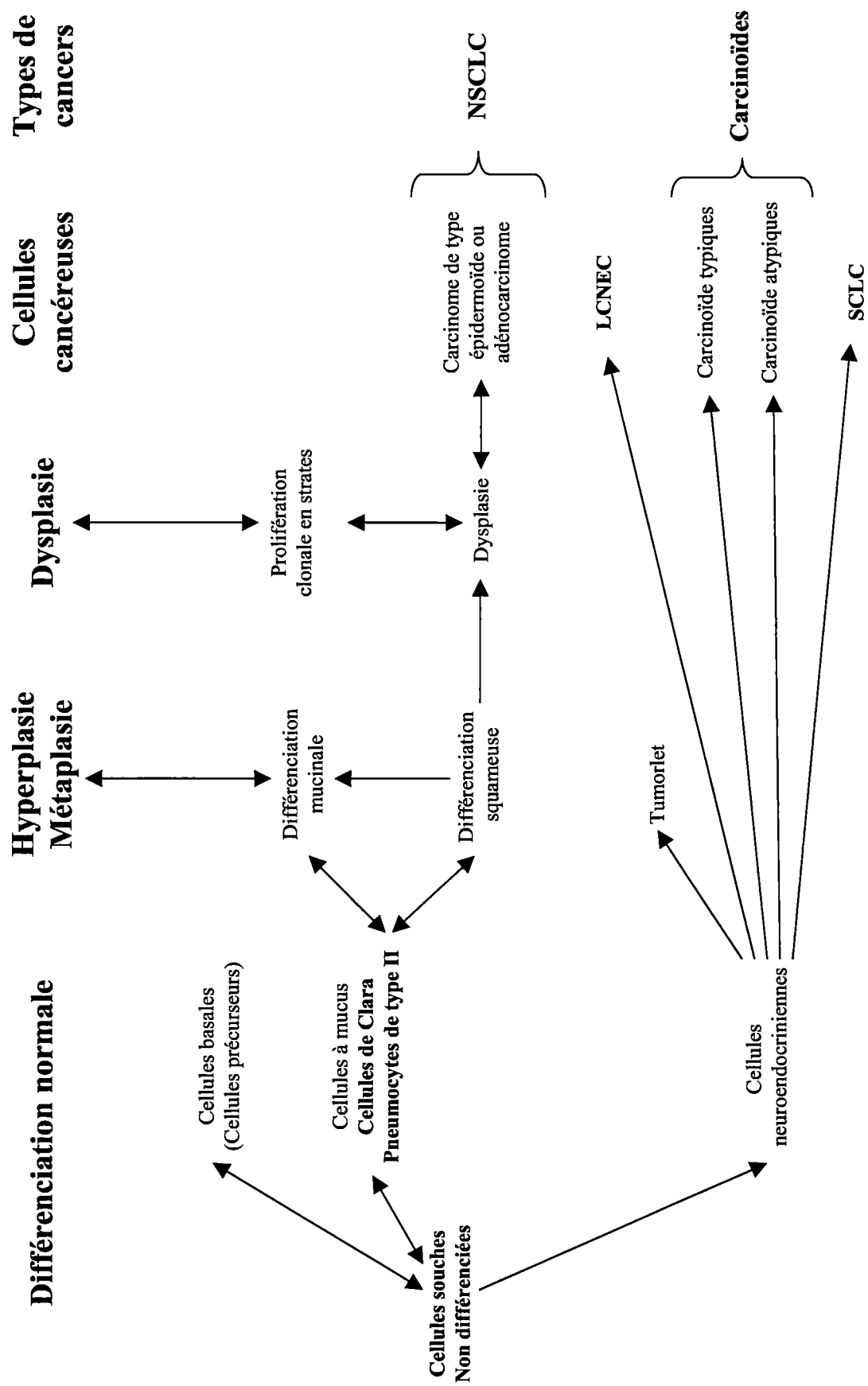
#### **1.2.2.2 Les NSCLC.**

Les NSCLC représentent 80% des cancers pulmonaires et regroupent trois types de cancers chez l'humain : les adénocarcinomes (40% des cancers pulmonaires), les carcinomes squameux (30 à 35% des cancers pulmonaires) et les carcinomes à grandes cellules (5 à 15% des cancers pulmonaires). Les NSCLC sont moins agressifs que les SCLC et se développent moins rapidement, augmentant ainsi les chances de survie des patients à ce type de cancers lorsqu'ils sont diagnostiqués à temps (Matthews et Linnoila, 1988).

**Figure 2 : Hypothèse sur l'origine cellulaire des cancers pulmonaires chez l'humain.**

L'origine cellulaire des différents types de cancers pulmonaires n'a pas encore été démontrée hors de tout doute. Cependant, différentes hypothèses ont été suggérées et sont exposées dans cette figure. Ces hypothèses indiquent que la majorité des cellules composant le système pulmonaire proviennent de cellules souches non différenciées et que seulement certains de ces types de cellules différenciées peuvent éventuellement être à l'origine des cancers pulmonaires. Ces deux différents types cellulaires seraient les cellules neuroendocriniennes, étant à l'origine des carcinoïdes, des SCLC (cancers pulmonaires à petites cellules) et des LCNEC (cancers pulmonaires neuroendocriniens à grandes cellules), et les cellules productrices de mucus à petits granules dont font partie les cellules de Clara et les pneumocytes de type II. Ces cellules seraient à l'origine des cancers de type NSCLC (cancers non-à-petites cellules). Lors du processus de tumorigenèse pulmonaire, ces cellules démontrent des symptômes d'hyperplasie et de dysplasie.





Les adénocarcinomes se développent habituellement à la périphérie des poumons et sont généralement associés aux bronches. Les adénocarcinomes de type bronchioloalvéolaires se développent à partir des alvéoles ou des bronchioles terminales. Ce type de cancer se développe principalement chez les fumeurs de cigarettes légères qui ont tendance à inhaler plus profondément la fumée dans les poumons (Franceschi et Bidoli, 1999). Les cellules de ce type de cancer sont généralement de forme cuboïdale et se regroupent pour former des structures de type glandulaire. Les carcinomes squameux, ou cancers épidermoïdes, se développent généralement dans les bronches principales ou secondaires. Ils tendent à se développer plus lentement que les autres types de cancers pulmonaires, et sont moins portés au développement de métastases, sauf à des stades avancés (Matthews et Linnoila, 1988). Les cellules dans ce type de cancer expriment fortement différentes isoformes de la cytokératine (cytokératines 1, 5, 10 et 14; Brambilla *et al.*, 2000). Les carcinomes à grandes cellules se développent généralement dans les petites bronches, et ce dans l'ensemble du poumon. Les tumeurs sont habituellement de grandes tailles au moment du diagnostic et sont composées de cellules plus grosses que la normale. Ces cellules sont caractérisées par un cytoplasme abondant, un noyau plus gros que la normale et des nucléoles proéminents (Matthews et Linnoila, 1988).

### **1.2.2.3 Les autres types de cancers pulmonaires.**

Les carcinoïdes se développent à partir de cellules neuroendocriniennes (figure 2). Ces cancers peuvent apparaître à plusieurs endroits dans l'organisme humain et notamment au niveau des bronches pulmonaires centrales. Ces cancers ne sont pas

associés au tabagisme ou à l'exposition à d'autres agents cancérigènes (Matthews et Linnoila, 1988). Ils se développent généralement dans la région centrale des poumons, au niveau des bronches et sont peu malins. Seulement 10 à 20% des carcinoïdes bronchopulmonaires produisent des métastases. Les cellules de ce type de cancer sont caractérisées par une plus grande abondance de gros granules de sécrétions que dans les cellules des cancers de type SCLC. Ces granules sont immunoréactifs pour plusieurs hormones et sont positifs à des tests détectant des hormones neuro-spécifiques comme l'énolase neurone spécifique, la sérotonine, la bombésine, la leu-enkephaline, la gastrine, la melanocortine, le peptide vasoactif intestinal et le polypeptide pancréatique) (Matthews et Linnoila, 1988). Finalement, les mésothéliomes pleuraux se développent habituellement à partir des cellules de la plèvre suite à une exposition à l'amiante et autres minéraux fibreux de la famille de l'amiante (Britton, 2002).

### **1.2.3 La génétique des cancers pulmonaires.**

Diverses anomalies génétiques ont été caractérisées dans les cancers pulmonaires. Par exemple, certains chromosomes sont fortement affectés lors du processus de tumorigenèse pulmonaire: le chromosome 3, le chromosome 9 et le chromosome 17.

Le chromosome 3 est le chromosome le plus souvent touché par des anomalies dans les cancers pulmonaires. De larges délétions y sont retrouvées dans 75% des NSCLC et dans près de 100% des SCLC (Salgia et Skarin, 1998). En fait, trois régions distinctes sont affectées par ces délétions interstitielles. Ces délétions ont été caractérisées dans les régions 3p25-3pTer, 3p21.3-3p23 et 3p14-cent (Salgia et Skarin,

1998). Au niveau de ces trois régions, il existe plusieurs gènes candidats potentiellement impliqués dans les cancers pulmonaires. Dans la région 3p25, nous retrouvons le gène tumeur suppresseur encodant pour le récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque bêta (RAR $\beta$ ), un facteur transcriptionnel ayant la capacité d'activer plusieurs gènes impliqués dans la tumorigenèse pulmonaire (Gazdar, 1994; Salgia et Skarin, 1998; Bérard *et al.*, 1996; Bérard *et al.*, 1994; Mattei *et al.*, 1988), le gène tumeur suppresseur VHL impliqué dans le syndrome de Von Hippel Lindau (Minna, 1993; Salgia et Skarin, 1998) et le gène codant pour le récepteur nucléaire  $\gamma$  activé par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR $\gamma$ ) qui pourrait être impliqué dans les cancers pulmonaires (Inoue *et al.*, 2001; Tsubouchi *et al.*, 2000; Beamer *et al.*, 1997). Dans la région 3p21.3-3p23, nous retrouvons le gène codant pour le récepteur de type II répondant au TGF $\beta$  (TGF $\beta$ -R2; Kang *et al.*, 2000; Mathew *et al.*, 1994), le gène codant pour la protéine RASSF1 faisant partie de la famille d'association au domaine RAS, une protéine présumée onco-suppresseur ayant la capacité de se lier à l'oncogène RAS pour activer la différenciation cellulaire et l'apoptose (Burbee *et al.*, 2001; Dammann *et al.*, 2000), les gènes codant pour DEF-3(g16/NY-LU-12) et LUCA15 qui ont la propriété de lier l'ARN (Drabkin *et al.*, 1999), le gène codant pour l'enzyme homologue activant la voie de l'ubiquitination (UBE1L) jouant un rôle dans le système d'ubiquitination et la dégradation de protéines (Kok *et al.*, 1995), le gène hMLH1 impliqué dans la réparation des erreurs de pairages au niveau de l'ADN (Xinarianos *et al.*, 2000; Benchenhou *et al.*, 1998) et le gène BAP1, une ubiquitin hydrolase qui lie la protéine BRCA1 afin d'amplifier son effet sur l'arrêt de la croissance cellulaire (Jensen *et al.*, 1998). Finalement, dans la région 3p14-cent, nous retrouvons le gène codant pour le récepteur

protéine-tyrosine phosphatase gamma (PTPRG; Pitterle *et al.*, 1998; Salgia et Skarin, 1998) et le gène codant pour le « Fragile Histidine triad » (FHIT) impliqué dans le métabolisme du diadénosine tetra-phosphate en adénosine triphosphate (ATP) et en adénosine monophosphate (AMP; Pitterle *et al.*, 1998; Salgia et Skarin, 1998). Il est intéressant de noter que le patron de délétion sur le chromosome 3, rencontré dans les cancers de type SCLC, diffère de celui rencontré dans les cancers de type NSCLC (Gazdar, 1994). De plus, certains gènes sur le chromosome 3 peuvent aussi être inactivés par méthylation du promoteur comme par exemple RAR $\beta$  (Virmani *et al.*, 2000; Gazdar, 1994).

Une perte ou une inactivation sur le chromosome 17 affectant l'expression du gène p53 (localisé en 17p13.1) est retrouvée dans 80 à 100% des cancers pulmonaires (Gazdar, 1994; Salgia et Skarin, 1998). La protéine p53 est reconnue comme un puissant onco-suppresseur. Elle a pour fonction d'inhiber la prolifération cellulaire et la synthèse de l'ADN. Lors de dommages important au niveau de l'ADN, p53 peut aussi activer l'apoptose (Salgia et Skarin, 1998).

Finalement, sur le chromosome 9, les gènes p16 et p15 (MTS1/p16INK4A et MTS1/ p15INK4B (localisés en 9p21-22) sont perdus ou inactivés dans 67% des NSCLC et sporadiquement au niveau des SCLC (Salgia et Skarin, 1998). Ces gènes sont des inhibiteurs reconnus du cycle cellulaire et ont un effet direct sur la kinase cycline-dépendante CDK4. En inhibant la CDK4, les protéines p16<sup>INK4A</sup> et p15<sup>INK4B</sup> empêchent les cellules d'entrer en phase S (Salgia et Skarin, 1998).

Différents oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs subissent des mutations lors du processus de tumorigenèse pulmonaire. Par exemple, le gène encodant la

protéine pRB (Salgia et Skarin, 1998). Cette protéine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire en permettant le passage en phase S lorsqu'elle est hyperphosphorylée (Salgia et Skarin, 1998). Le gène encodant pour la protéine Ras est aussi souvent muté (Salgia et Skarin, 1998). Cette protéine est un puissant oncogène faisant partie de la cascade d'activation des MAPKinases (Salgia et Skarin, 1998). On retrouve aussi dans certains cas de cancers pulmonaires une sur-activation de l'expression des gènes *myc*, un régulateur transcriptionnel (Gazdar, 1994; Salgia et Skarin, 1998), et *HER2/neu* (aussi connu sous le nom de *c-erbB-2*), le récepteur du facteur de croissance « epidermal growth factor » (EGF; Gazdar, 1994; Salgia et Skarin, 1998).

Il est intéressant de remarquer que les anomalies rencontrées sur le chromosome 3, avec l'hyperprolifération et l'aneuploïdie, surviennent précocement dans le processus de tumorigenèse pulmonaire alors que les mutations sur p53 arrivent plus tardivement au cours du processus de néoplasie (Gazdar, 1994). Ainsi, les délétions rencontrées sur le chromosome 3 pourraient constituer le ou les éléments déclencheurs dans le processus de néoplasie pulmonaire (Gazdar, 1994).

### **1.3 Le récepteur à l'acide rétinoïque bêta: gène candidat impliqué dans les cancers pulmonaires.**

#### **1.3.1 Introduction.**

Parmi les gènes affectés par les délétions sur le chromosome 3 dans les cancers pulmonaires, nous retrouvons le gène *RAR $\beta$*  (Mattei *et al.* 1988). Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce gène et ce pour plusieurs raisons: l'acide rétinoïque all-

*trans* (AR all-*trans*) et l'acide rétinoïque 9-*cis* (AR 9-*cis*) sont des dérivés métaboliques de la vitamine A ou rétinol ainsi que des esters de rétinyls et de la  $\beta$ -carotène (Vogel et al, 1999). Ces dérivés métaboliques, appelés rétinoïdes, sont reconnus pour avoir des actions biologiques importantes et sont les ligands des récepteurs de l'acide rétinoïque dont fait partie le récepteur RAR $\beta$ . Ainsi, les rétinoïdes contrôlent le développement embryonnaire (Le Moigne, 1997), induisent la différenciation cellulaire (Hansen *et al.*, 2000), inhibent la prolifération cellulaire (Raz et Kelley, 1997), induisent l'apoptose (Rogers, 1997) et inhibent l'angiogenèse (Liaudet-Coopman *et al.*, 1997; Oikawa *et al.*, 1989). Ils ont aussi la capacité d'influencer le système immunitaire (Bérard *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997) et d'influencer l'expression d'oncogènes et de gènes supresseurs de tumeurs (Pfitzner *et al.*, 1998). La majorité de ces effets biologiques sont assurés par la grande famille de récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque constitués des RAR et des récepteurs des rétinoïdes (RXR).

### **1.3.2 La famille des récepteurs nucléaires répondant à l'acide rétinoïque.**

Les récepteurs à l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription retrouvés généralement sur l'ADN même en absence de leur ligand, l'acide rétinoïque (Piedrafita et Pfahl, 1999). Les récepteurs répondant à l'acide rétinoïque sont classés en deux familles de récepteurs selon leur degré de conservation au cours de l'évolution: les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs des rétinoïdes (RXR). Chacune de ces deux familles est composée de trois isotypes (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) encodés par des gènes différents (Figure 3; Petkovich *et al.*, 1987; Giguère *et al.*, 1987, 1990;

**Figure 3: Isoformes des deux familles de récepteurs de l'acide rétinoïque.**

RAR (récepteur à l'acide rétinoïque) et RXR (récepteurs aux rétinoïdes) sont les deux familles qui composent les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque. Chacune de ces deux familles de récepteurs se subdivise en trois isotypes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) codés par des gènes différents. Chaque gène produit une multitude d'isoformes (par exemple RAR $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4). Les isoformes d'un même isotype ne varient que par leur région NH<sub>2</sub>-terminale. Les isoformes d'un même isotype sont générées par l'usage de promoteurs en tandem, des mécanismes alternatifs d'épissage, et par l'usage de codons d'initiation alternatifs de la traduction. Le schéma illustre les principaux isoformes de RAR  $\alpha$  et RAR $\gamma$ . Notez l'absence du domaine NH<sub>2</sub>-terminal chez l'isoforme RAR $\beta$ 4 (A).



# RAR



# RXR



Benbrook *et al.*, 1988; Brand *et al.*, 1988; Krust *et al.*, 1989; Hamada *et al.*, 1989; Mangelsdorf *et al.*, 1990, 1992; Yu *et al.*, 1991; Leid *et al.*, 1992; Piedrafita et Pfahl, 1999). Chacun de ces gènes peut générer plusieurs isoformes par l'usage de promoteurs en tandem, de codons alternatifs d'initiation de la traduction et par épissage alternatif (Lehmann *et al.*, 1991; Leroy *et al.*, 1992). Ces différentes isoformes sont exprimées au cours du développement et dans les tissus matures de façon spécifique, laissant croire qu'elles pourraient jouer des rôles particuliers dans la régulation du développement au cours de l'embryogenèse ou dans des processus biologiques tissus-spécifiques. Les RAR sont les principaux effecteurs des dérivés de la vitamine A (Piedrafita et Pfahl, 1999). Cependant, pour transmettre efficacement le signal des rétinoïdes, les RAR agissent sous la forme d'hétérodimères avec l'un des isotypes des RXR. Les RXR sont les principaux partenaires d'hétérodimérisation des RAR et sont considérés comme des corégulateurs essentiels. Seuls les hétérodimères RAR-RXR lient efficacement l'ADN (Piedrafita et Pfahl, 1999). L'activation de ce complexe est initiée uniquement par les RAR puisque le corégulateur RXR ne répond pas à ses propres ligands si ceux du RAR sont absents (Kurokawa *et al.*, 1994). Lorsque le corégulateur RXR est activé par son ligand, il peut cependant amplifier une réponse induite par le ligand lié au RAR (Minucci *et al.*, 1997). Par contre, le corégulateur RXR a aussi la possibilité de lier l'ADN sous forme d'homodimère (RXR-RXR) et d'induire une réponse à l'acide rétinoïque 9-*cis* (Zhang *et al.*, 1992).

Les RAR répondent à la fois au AR 9-*cis* et au AR all-*trans* alors que les RXR ne répondent uniquement qu'au AR 9-*cis*. Aucun autre ligand naturel spécifique à RXR

n'est connu à ce jour. Cependant, différents ligands synthétiques pour les RXR (rexinoïdes) ont été générés (Piedrafita et Pfahl, 1999).

Les récepteurs nucléaires RAR et RXR exercent leurs effets en modulant l'expression de gènes cibles via des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE et RXRE; Piedrafita et Pfahl, 1999) contenus dans le promoteur des gènes cibles. Étant donné que les récepteurs à l'acide rétinoïque agissent généralement en tandem, les éléments de réponse de type RARE et RXRE sont composés de deux séquences consensus situées à proximité l'une de l'autre dans le promoteur des gènes cibles. La séquence consensus des demi-sites qui est reconnue par les récepteurs à l'acide rétinoïque est la suivante : AGGTCA (Piedrafita et Pfahl, 1999). La disposition des demi-sites consensus est critique dans la détermination du type d'hétérodimère/homodimère qui se liera au RARE ou au RXRE. Par le fait même, l'arrangement déterminera l'effet du complexe exercé sur la régulation du gène cible soit une inhibition ou une activation de son expression (Piedrafita et Pfahl, 1999). L'arrangement des RARE et des RXRE peut varier de plusieurs façons, le plus courant étant la disposition en répétition directe séparée par 1 nucléotide pour les RXRE ou de 2, 4, 5 ou 8 nucléotides pour les RARE. Ces arrangements sont appelés respectivement des éléments de réponses de type DR-1, DR-2, DR-4, DR-5 et DR-8 (figure 4; Piedrafita et Pfahl, 1999, Clagett-Dame et Plum, 1997). Cependant, il existe aussi d'autres arrangements possibles pour les RARE. Ces arrangements sont retrouvés beaucoup moins fréquemment. Il s'agit de palindromes (Pal-0, Pal-9; figure 4) et de palindromes inversés séparés par 6 ou 8 nucléotides (IP-6 et IP-8; figure 4) ou encore d'agencements complexes de plusieurs séquences consensus (figure 4; Piedrafita et

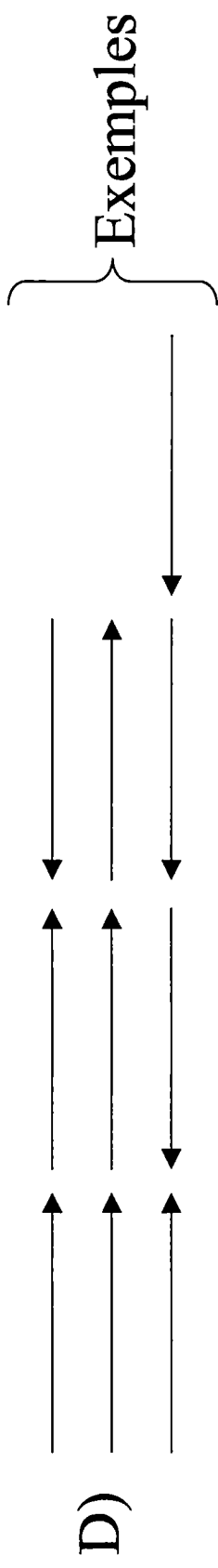
**Figure 4 : Agencement des demi-sites consensus dans les RARE.**

Les récepteurs à l'acide rétinoïque reconnaissent l'ADN via des éléments de réponses (RARE). L'organisation des demi-sites consensus (AGGTCA) dans les RARE détermine le type de récepteurs pouvant se lier à l'ADN ainsi que l'agencement de ces récepteurs nucléaires sur l'ADN (homodimère ou hétérodimère). Cela déterminera l'effet de ces récepteurs sur le gène cible. L'agencement le plus fréquent retrouvé dans les RARE est la répétition directe des demi-sites consensus séparés de "N" nucléotides appelée DR-1, DR-2, DR-4, DR-5 et DR-8 (A). Il existe aussi des agencements de demi-sites consensus en palindrome (Pal-0 et Pal-9; B), en répétitions inversées (IP-6 ou IP-8; C) ou des agencements complexes de plusieurs séquences consensus (D).

A) AGGTCA N AGGTCA → N = 1, 2, 4, 5 et 8 nucléotides

B) AGGTCA N TGACCT → N = 0 et 9 nucléotides

C) TGACCT N AGGTCA → N = 6 et 8 nucléotides



Pfahl, 1999, Clagett-Dame et Plum, 1997). Contrairement aux hétérodimères RAR-RXR, les homodimères RXR-RXR ne se lient que sur les éléments de réponse de type DR-1 (Piedrafita et Pfahl, 1999).

La liaison des hétérodimères RAR-RXR et des homodimères RXR-RXR sur l'ADN est indépendante du ligand. En absence du ligand, les récepteurs liés à l'ADN ont généralement la capacité de réprimer la transcription du gène cible (Piedrafita et Pfahl, 1999). Cela s'explique par le fait qu'en absence du ligand, un complexe composé d'un co-répresseur (N-CoR/SMRT), de Sin3 et d'une histone déacétylase (HDAC1) se lie aux récepteurs nucléaires dimérisés (Piedrafita et Pfahl, 1999; Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997). En présence de ce complexe, les histones sont déacétylées faisant en sorte que la structure de la chromatine est plus compacte ce qui empêche la transcription du gène cible en diminuant l'accès de la machinerie transcriptionnelle de base au promoteur (Piedrafita et Pfahl, 1999). Cette inhibition est renversée par la liaison du ligand qui induit un changement de la structure allostérique du récepteur cible. Le complexe co-répresseur est alors libéré pour être remplacé par un complexe coactivateur. Ce complexe est composé d'un coactivateur (N-CoA) lié avec un co-intégrateur (CBP) associé avec son facteur d'association (P/CAF; Piedrafita et Pfahl, 1999). CBP et P/CAF possèdent une activité histone-acétyl-transférase (Ogryzko *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). En présence de ce nouveau complexe, les histones sont acétylées et la structure de la chromatine est alors ouverte, permettant à la machinerie transcriptionnelle de base d'avoir un meilleur accès au promoteur du gène cible afin d'initier la transcription du gène (Piedrafita et Pfahl, 1999).

### 1.3.3 Convergence des voies de signalisations.

Les RAR et les RXR, en plus d'avoir la capacité de former des homodimères RXR-RXR ou des hétérodimères RXR-RAR, ont aussi la capacité d'interagir avec d'autres voies de signalisation en formant des hétérodimères avec d'autres types de récepteurs nucléaires. Ainsi, les RAR ont la capacité de dimériser avec le partenaire hétérodimérique d'inhibition (SHP) (Klinge *et al.*, 2001), avec les récepteurs de l'œstrogène (ER $\alpha$  et  $\beta$ ) (Song *et al.*, 1998), avec COUP-TF (facteur de transcription liant le promoteur en amont du gène de l'ovalbumine chez le poulet; COUP  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (Berrodin *et al.*, 1992), avec les récepteurs thyroïdiens (TR  $\alpha$  et  $\beta$ ) (Glass *et al.*, 1989) et avec les récepteurs de la vitamine D3 (VDR) (Schrader *et al.*, 1993). Finalement, les RXR ont la capacité de dimériser avec les partenaires hétérodimériques d'inhibition (SHP) (Klinge *et al.*, 2001), les récepteurs thyroïdiens (Ribeiro *et al.*, 2001), les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (Bardot *et al.*, 1993), les récepteurs de l'œstrogène (Song *et al.*, 1998), les récepteurs de la vitamine D3 (Carlberg *et al.*, 2001), les récepteurs des farnésoïdes (FXR) (Laffite *et al.*, 2000), les récepteurs des oxystérols (LXR  $\alpha$  et  $\beta$ ) (Willy *et al.*, 1995), les récepteurs des androstanes (CAR) (Honkakoski *et al.*, 1998), COUP-TF (Butler et Parker, 1995), le récepteur des pregnanes (PXR) (Pascussi *et al.*, 1999) et les récepteurs des rexinoïdes (NGFI-B  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (Perlmann et Jansson, 1995).

Le rôle rempli par le corégulateur RXR dans la formation de ces hétérodimères, en présence de 9-*cis* RA, peut varier. Dans le cas de RAR et TR, le corégulateur RXR est silencieux (Forman *et al.*, 1995). On dit alors qu'il est un partenaire de séquestration et que son rôle est non permissif. Cependant, pour les autres récepteurs (excepté VDR)

les gènes cibles pourront être activés à la fois par le ligand de RXR et/ou par le ligand de son partenaire d'hétérodimérisation. On dit alors que le corégulateur RXR est un partenaire d'hétérodimérisation permissif. Dans le cas du récepteur à la vitamine D3 (VDR), la liaison du ligand de RXR provoque la dissociation du complexe dimérique RXR-VDR (Cheskis et Freedman, 1994). Il est important de noter qu'en absence de RXR, les récepteurs mentionnés ci-haut sont dans l'impossibilité de lier efficacement l'ADN et seront alors incapables de remplir leurs rôles respectifs.

Par ailleurs, il existe d'autres possibilités d'interaction entre les différents récepteurs nucléaires. Par exemple, COUP-TF a la capacité de lier fortement sous forme d'homodimère certains RARE et empêche ainsi la liaison des hétérodimères RAR-RXR sur l'ADN (Tran *et al*, 1992). La voie des rétinoïdes sera alors inhibée dans les cellules exprimant fortement COUP-TF. Il est bon de noter que ces diverses interactions peuvent s'avérer très importantes au niveau des cellules, et peuvent augmenter (ou diminuer) largement l'effet des rétinoïdes sur l'homéostasie cellulaire.

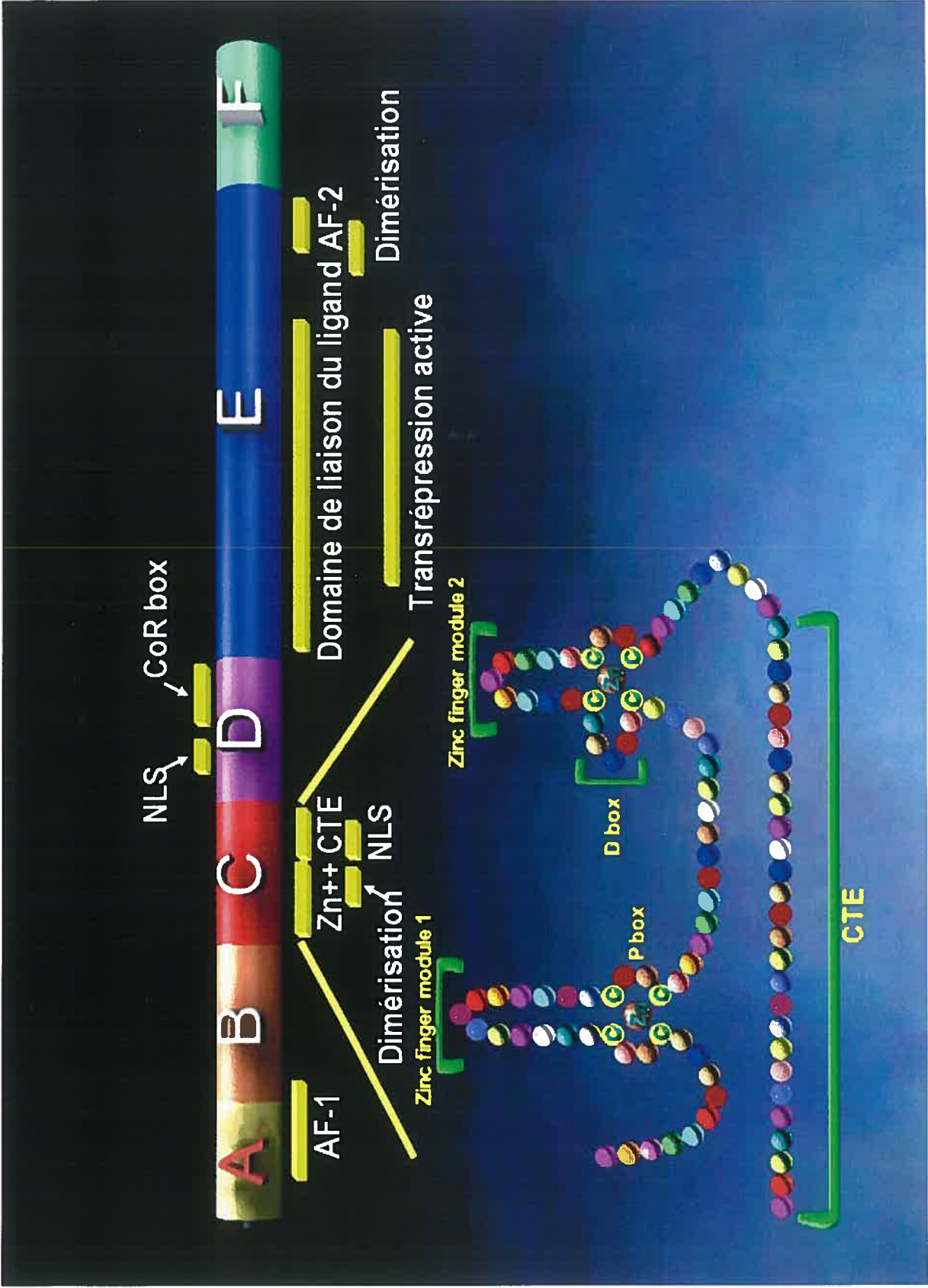
#### **1.3.4 Les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires répondant à l'acide rétinoïque.**

Les RAR et les RXR possèdent des séquences protéiques présentant beaucoup d'homologies entre elles correspondant aux différents domaines fonctionnels. Dans le cas des RAR, six domaines fonctionnels sont retrouvés alors que les RXR n'en contiennent que cinq (Figure 5) (Sladek et Giguère, 2000; Giguère, 1999). Les domaines A et B sont appelés domaines modulateurs, le domaine C est appelé domaine de liaison à l'ADN, le domaine D est appelé le domaine charnière, le domaine E est



**Figure 5: Les domaines fonctionnels des récepteurs à l'acide rétinoïque.**

Les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque se divisent en six domaines fonctionnels : Les domaines A et B qui constituent le domaine modulateur, le domaine C appelé le domaine de liaison à l'ADN, le domaine D appelé le domaine charnière, le domaine E appelé le domaine de liaison du ligand et le domaine F, dont la séquence est peu conservée et dont la fonction est inconnue. Ce domaine est présent dans les récepteurs RAR, mais absent dans les récepteurs RXR. Chaque domaine exerce des fonctions distinctes tel qu'illustrées dans le schéma : fonction AF-1 (fonction activatrice ligand indépendante), NLS (signal de localisation nucléaire), CTE (extension carboxy-terminale), CoR box (site de liaison des co-répresseurs) et fonction AF-2 (fonction activatrice ligand-dépendante).



appelé domaine de liaison du ligand et le domaine F est un domaine dont la fonction est encore inconnue et sa séquence est peu conservée.

#### 1.3.4.1 Les domaines modulateurs A et B.

Le domaine A, retrouvé à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du récepteur, est hautement variable en terme de taille et d'homologie. Cette variabilité est générée par l'usage de promoteurs en tandem, l'usage de codons d'initiation alternatifs et des mécanismes d'épissage alternatifs. La séquence du domaine A constitue la seule différence qui caractérise les différentes isoformes des RAR et des RXR. Dans le cas des domaines B, C, D, E et F, les séquences sont identiques pour toutes les isoformes du même isotype et sont relativement bien conservées entre les espèces. Les domaines A/B (figure 5) possèdent une fonction de transactivation ligand indépendante appelée AF-1 (Nagpal *et al.*, 1993). L'activité de ce domaine est régulée par des interactions directes avec les co-activateurs des récepteurs stéroïdiens et d'autres facteurs tissus-spécifiques. Ce domaine permet de réguler l'activité transcriptionnelle du gène cible de façon tissu-spécifique selon les facteurs présents. Il est à noter que le domaine A fonctionne en synergie avec le domaine de transactivation ligand dépendant AF-2 retrouvé dans le domaine E (Nagpal *et al.*, 1993). Chez certains récepteurs, l'activité du domaine de transactivation AF-1 peut être augmentée par la phosphorylation de certains résidus par la « mitogen-activated protein kinase » (MAPK1; Kato *et al.*, 2000), les protéines kinases cycline-dépendantes (CDK2, CDK7; Rogatsky *et al.*, 1999; Bastien *et al.*, 2000) et la protéine kinase ribosomale S6 (pp90rsk1; Joel *et al.*, 1998). Il est important de noter que RAR $\beta$ 4, contrairement aux autres isoformes de RAR $\beta$ , ne contient pas le

domaine A porteur de la fonction de transactivation AF-1. Ceci suggère que ce récepteur nucléaire puisse être moins efficace pour activer la transcription du gène cible et ce même en présence du ligand. Il a été suggéré que RAR $\beta$ 4 serait un isoforme dominant négatif (Sommer *et al.*, 1999, Bérard *et al.*, 1994).

#### **1.3.4.2 Le domaine de liaison à l'ADN.**

Le domaine C (figure 5), région la plus conservée des récepteurs nucléaires, est responsable de la liaison à l'ADN. Il est composé de deux modules en doigts de zinc composés de 66 à 70 acides aminés et d'une extension carboxy-terminale (CTE). La structure des doigts de zinc comprend la boîte P, qui est impliquée dans la reconnaissance de la séquence consensus du demi-site de l'élément de reconnaissance (Giguère, 1994), et la boîte D qui est impliquée dans la dimérisation des récepteurs. Le CTE joue plusieurs rôles : il fournit des interfaces protéines-ADN et des interfaces protéines-protéines et porte une partie de la séquence de localisation nucléaire (NLS) retrouvée chez certains récepteurs nucléaires comme les récepteurs stéroïdiens (Black *et al.*, 2001).

#### **1.3.4.3 Le domaine charnière.**

Le domaine D (figure 5), appelé domaine charnière, est hypervariable en terme de longueur et d'homologie. Cette région protéique du récepteur est très flexible et permet au domaine de liaison à l'ADN une rotation de 180° afin que les récepteurs nucléaires puissent se lier comme dimères à la fois sur des éléments de réponses en répétitions directes (DR) ou inversées (palindrome). Ce domaine peut également

comporter un signal de localisation nucléaire (NLS) tel que retrouvé chez le récepteur de la vitamine D3 (Michigami *et al.*, 1999) afin d'assurer le transfert du récepteur au noyau (Picard et Yamamoto, 1987). Des sites d'acétylation par CBP/P300 (Wang *et al.*, 1996) et de phosphorylation (Takimoto *et al.*, 2001) ont été identifiés chez certains récepteurs. Ils permettent de moduler le transport nucléaire ainsi que les capacités de transactivation de ces récepteurs nucléaires. Le domaine charnière peut aussi contenir un site d'arrimage pour les co-répresseurs (CoR box) (Horlein *et al.*, 1995).

#### **1.3.4.4 Le domaine de liaison du ligand et le domaine F.**

Le domaine E (figure 5) est le domaine de liaison du ligand. Cette section est relativement bien conservée entre les différents types de récepteurs. Ce domaine assure la spécificité de réponse au ligand. Le domaine E est aussi impliqué dans la dimérisation des récepteurs. Il contient une fonction de transrépression active et une fonction de transactivation ligand-dépendante appelée AF-2. Cette fonction AF-2 permet de lever l'inhibition induite par le domaine de transrépression active suite à la liaison du ligand. Rappelons que la fonction de transactivation AF-2 collabore avec la fonction de transactivation AF-1 située dans le domaine A (McKenna *et al.*, 1999).

La fonction du domaine F (figure 5) est encore inconnue. Il est à noter que les RAR possèdent un domaine F alors qu'il est absent chez les RXR (Chambon, 1996; Giguère, 1994).

### 1.3.5 Implication de RAR $\beta$ dans les cancers pulmonaires.

Le gène de RAR $\beta$  est localisé dans une région du bras court du chromosome 3 souvent affectée par des délétions chromosomiques caractérisées dans divers types de cancers dont le cancer du poumon. La première évidence de l'implication de RAR $\beta$  dans les cancers remonte à sa découverte en 1986 alors que des études ont montré une intégration du virus de l'hépatite B dans le gène codant pour RAR $\beta$  dans un cancer hépatocytaire humain (Dejean *et al.*, 1986). L'expression de RAR $\beta$  est réduite ou absente dans plusieurs cancers retrouvés chez l'Humain (46% des carcinomes de l'œsophage et 93% des cancers du sein) (Qiu *et al.*, 1999; Wildschwendter *et al.*, 1997). De plus, au niveau des cancers pulmonaires, RAR $\beta$  est indétectable dans 32% des tumeurs de type NSCLC et est faiblement exprimé dans un autre 41% des cas (Khuri *et al.*, 2000). De plus, dans 75% des lignées cellulaires dérivant de cancers pulmonaires de type SCLC, une perte de l'expression de RAR $\beta$ 2 est retrouvée (Virmani *et al.*, 2000; Geradts *et al.*, 1993). Ceci indique que jusqu'à 75% des cancers pulmonaires ont une expression diminuée ou inexistante de RAR $\beta$ .

Enfin, il est intéressant de noter que l'acide rétinoïque (AR) est reconnu pour son rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses provenant entre autres du poumon, de l'estomac, du foie et du sein (Lokshin *et al.*, 1999; Czczuga-Semeniuk *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). De plus, la réexpression de RAR $\beta$  dans des lignées cellulaires tumorales induit une perte de tumorigénicité (Li *et al.*, 1998; Houle *et al.*, 1993). Cette capacité anti-tumorale de l'AR s'explique par son habileté à réduire la prolifération cellulaire et à induire la différenciation cellulaire et l'apoptose. Cependant, certaines lignées

cellulaires tumorales de cancers pulmonaires (H292, H661, SK-MES-1 et CALU-1) sont réfractaires aux traitements à l'AR (Li *et al.*, 1998; Houle *et al.*, 1993). Dans certaines de ces lignées cellulaires (H661, SK-MES-1 et CALU-1), la résistance à l'AR est renversée par la transfection d'un vecteur d'expression portant une copie du gène RAR $\beta$  (isoforme RAR $\beta$ 2).

Des modèles d'animaux transgéniques sont disponibles dans notre laboratoire. Ces modèles animaux nous permettent d'étudier les conséquences d'une altération de l'expression des différentes isoformes de RAR $\beta$  sur l'incidence du cancer du poumon et d'étudier les cibles potentielles, contrôlées par ce récepteur nucléaire, et impliquées dans la tumorigenèse pulmonaire (Bérard *et al.*, 1996; Bérard *et al.*, 1994). Parmi ces modèles, nous retrouvons des souris portant un transgène exprimant un ARN antisens contre l'isoforme RAR $\beta$ 2 et des souris portant un transgène exprimant un ARN antisens contre les isoformes RAR $\beta$ 1 et RAR $\beta$ 3. Chez ces souris, une diminution de la présence protéique des isoformes ciblées est remarquée de même qu'une forte augmentation de l'incidence d'apparition de cancers pulmonaires, démontrant que ces récepteurs participent activement aux processus de tumorigenèse pulmonaire. Par ailleurs, nous avons des modèles de souris transgéniques portant un transgène exprimant un ARN semblable à l'isoforme RAR $\beta$ 4. Chez ces souris, nous remarquons aussi une forte augmentation de l'incidence de cancers pulmonaires. Rappelons que l'isoforme RAR $\beta$ 4 ne possède pas le domaine A porteur de la fonction de transactivation AF-1 et qu'il pourrait agir comme isoforme dominante négative (Sommer *et al.*, 1999). Ainsi, RAR $\beta$ 4 pourrait compétitionner avec la liaison des isoformes tumeur suppresseurs RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 3 et les empêcher d'accomplir leurs rôles (Houle *et al.*, 1993).

Fait intéressant, chez les lignées cellulaires dérivées de cancers pulmonaires de type épidermoïde, il y a généralement une perte d'expression de RAR $\beta$ 2 tandis qu'il y a généralement une surexpression de l'isoforme RAR $\beta$ 4 au niveau des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires (Bérard *et al.*, 1994), ce qui suggère que l'isoforme RAR $\beta$ 4 pourrait avoir des propriétés oncogéniques importantes et serait impliquée dans les processus du développement des cancers pulmonaires. En résumé, nous pouvons affirmer que les isoformes RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 3 sont des isoformes tumeur supresseurs alors que l'isoforme RAR $\beta$ 4 est considérée comme ayant un caractère oncogénique.

Une inactivation du gène RAR $\beta$  par hyperméthylation des promoteurs en tandem peut expliquer la perte ou la diminution de l'expression de RAR $\beta$  dans les cancers pulmonaires (Virmani *et al.*, 2000) ainsi que dans les cancers de la vessie (Maruyama *et al.*, 2001), du colon (Côté et Momparler, 1997), de l'estomac (Hayashi *et al.*, 2001) et du sein (Widschwendter *et al.*, 2001) pour ne nommer que ceux-ci. De plus, la perte du cofacteur E1A-like permet une activation synergique du promoteur P2. Ce promoteur régule la transcription des isoformes de RAR $\beta$ 2 et de RAR $\beta$ 4 (Kruyt *et al.*, 1993; Folkers *et al.*, 1996). Enfin, l'expression de RAR $\beta$  peut dépendre de la quantité de rétinoïdes présent dans la cellule puisque le promoteur P2, générant les isoformes RAR $\beta$ 2 et  $\beta$ 4, contient un RARE de type DR5 fortement inductible en présence de l'AR (Xiao *et al.*, 1995).

Les ligands des RAR sont utilisés pour traiter certains types de cancers dans des protocoles de chimiothérapie ou de chimioprévention. De cette façon, diverses lésions préneoplasiques, les cancers de la peau (Bavinck *et al.*, 1995), les cancers pulmonaires



(Khuri et Lippman, 2000; Toma *et al.*, 1999), les tumeurs de la prostate (Pili *et al.*, 2001), les cancers de la bouche (Zeng *et al.*, 2000) et les leucémies promyélocytaïres aiguës (Fenaux *et al.*, 2001) peuvent être traitées. À cet effet, divers rétinoïdes synthétiques de deuxième génération avec des affinités restreintes pour certains des RAR ont été synthétisés par des compagnies pharmaceutiques afin de traiter de façon spécifique certains cancers en évitant au maximum les effets secondaires en ne stimulant qu'une seule voie de signalisation au lieu des trois. Ces traitements permettent de récupérer dans certains cas l'expression endogène du récepteur de l'acide rétinoïque RAR $\beta$  et de rétablir cette voie de signalisation (Pili *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 1999).

Le mécanisme par lequel RAR $\beta$  empêche la prolifération cellulaire est encore inconnu. Par contre, plusieurs travaux suggèrent que RAR $\beta$  a le pouvoir de réguler la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaires. Lorsque RAR $\beta$  est surexprimé dans une lignée cellulaire cancéreuse, l'expression de Bax, Bak, Apaf 1 et des caspases 1 et 9 est augmentée (Hayashi *et al.*, 2001). Par ailleurs, la réexpression de RAR $\beta$  dans une lignée cellulaire provenant d'un carcinome squameux (SSC) conduit à sa différenciation terminale (Crowe, 1998). Finalement, le promoteur de p21waf/cip1 s'avère être une cible directe de RAR (Liu *et al.*, 1996). Notons que p21waf/cip1 joue un rôle très important comme inhibiteur du cycle cellulaire (Boulaire *et al.*, 2000).

D'autre part, les gènes homéotiques *Hox*, contrôlés par l'AR, pourraient représenter des cibles importantes, affectées par les aberrations de l'expression de

RAR $\beta$ , dans les cancers pulmonaires. En effet, plusieurs gènes *Hox* sont régulés par les RAR et certains de ces gènes clés montrent un potentiel oncogénique.

#### **1.4 Les gènes à homéodomaines de la famille *Hom/Hox*.**

##### **1.4.1 Introduction.**

Les gènes *Hom/Hox* font partie de la famille des gènes à homéodomaine. Les gènes à homéodomaine ont été découverts pour la première fois chez la drosophile dans le complexe bithorax/antennapedia (Le Moigne, 1997; Lewis, 1978). Ce complexe, composé de 8 gènes similaires, est appelé *Hom*. Ces gènes ont été associés au développement embryonnaire, entre autres dans la segmentation chez la drosophile (Le Moigne, 1997; Lewis, 1978). Les premiers gènes homéotiques de type *Hox* ont été découverts chez les souris (Le Moigne, 1997) et chez l'humain (Le Moigne, 1997; Bucan *et al.*, 1986). Les gènes *Hox* sont très similaires aux gènes du complexe bithorax retrouvés chez la drosophile et, très rapidement, les gènes homéotiques de type *Hox* ont aussi été associés au développement embryonnaire chez les mammifères. Ces gènes *Hox* sont exprimés très tôt lors du développement embryonnaire et participent activement à la formation de l'axe antéro-postérieur (Le Moigne, 1997). Les gènes *Hox* participent aussi à la morphogenèse des membres lors de la formation des axes antéro-postérieur et proximo-distal (Le Moigne, 1997). A des stades plus avancés de l'embryogenèse, les gènes *Hox* participent aussi au processus d'identité cellulaire, au contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire et au contrôle de l'apoptose et de l'angiogenèse (Rosen *et al.*, 1996; Cohn *et al.*, 1997; Helgason *et al.*, 1996; Soncin

*et al.*, 1999). Rappelons que tous ces processus peuvent être associés à la tumorigenèse. En fait, les gènes à homéodomaine sont des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes cibles responsables de ces divers effets.

Certains de ces gènes *Hox* sont toujours exprimés au stade adulte (Cillo, 1995; Kappen, 1996) et pourraient jouer un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. De plus, l'expression aberrante de certains gènes *Hox* au stade adulte semble être impliquée dans la tumorigenèse. Mais avant de poursuivre sur ce sujet, commençons d'abord par parler de la structure du produit de ces gènes : les protéines Hox.

#### **1.4.2. Structures des protéines Hox.**

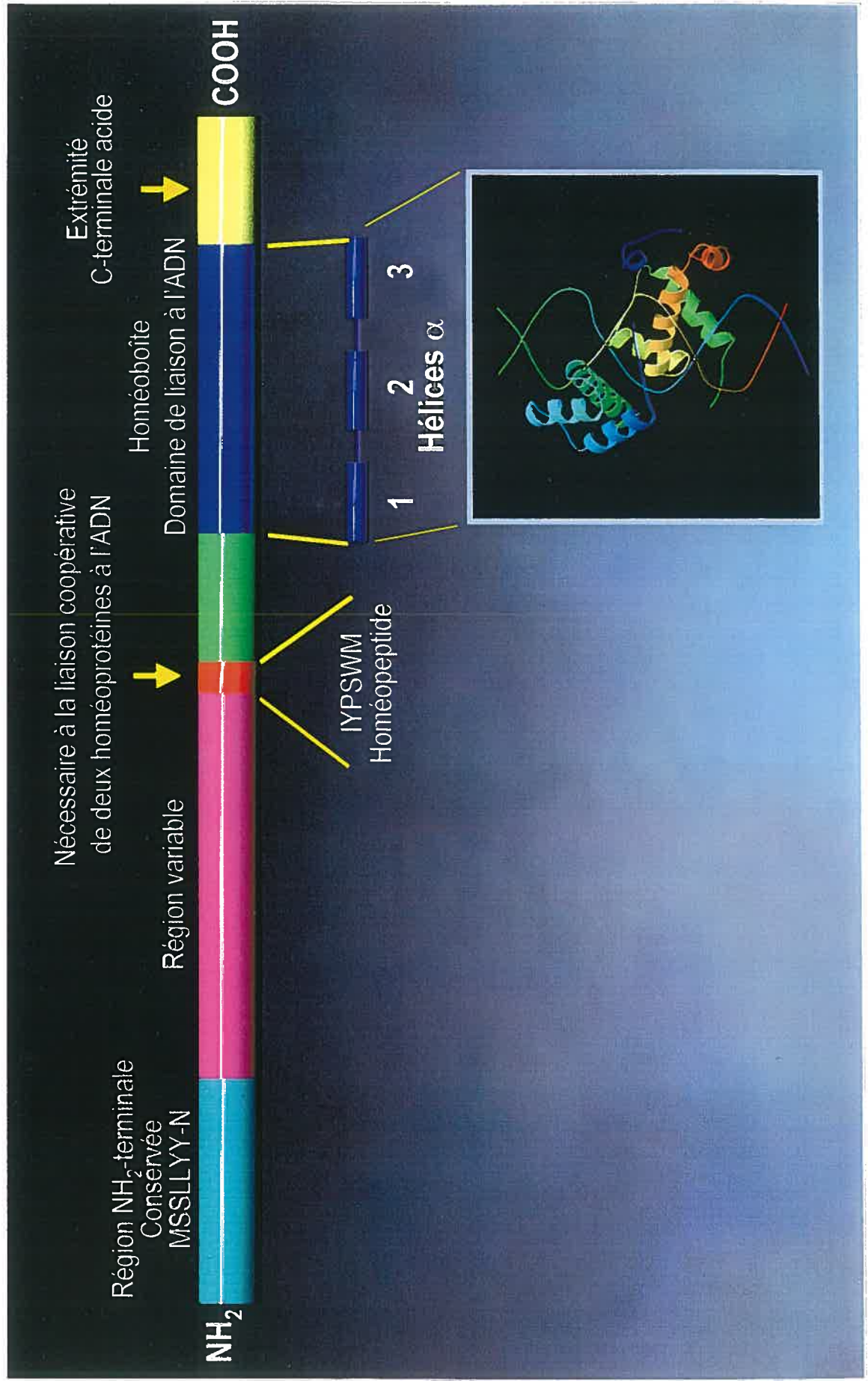
La caractéristique principale des protéines Hox est la présence d'une homéoboîte. Ce domaine d'une soixantaine d'acides aminés est hautement conservé dans toutes les protéines à homéoboîtes (figure 6). L'homéoboîte adopte une structure tridimensionnelle hélice/tour/hélice formée de quatre hélices alpha. Cette structure est impliquée dans la reconnaissance et la liaison d'une séquence consensus sur l'ADN (5'-T<sub>1</sub>N<sub>2</sub>A<sub>3</sub>T<sub>4</sub>(G/T)<sub>5</sub>(G/A)<sub>6</sub>-3').

Les homéoboîtes de toutes les protéines Hox étant très semblables, elles ne peuvent assurer seules une spécificité pour les promoteurs cibles. Le reste de la protéine devient alors importante pour assurer cette spécificité. A cet effet, d'autres zones hautement conservées sont retrouvées dans les protéines Hox.

En premier lieu, la présence d'un térapeptide, composé de 4 à 7 acides aminés, (aussi appelé motif YPWM ou homéopeptide, figure 6) est retrouvé en amont de l'homéoboîte et va participer à la dimérisation de ces protéines avec PBX, une autre

**Figure 6 : Les domaines fonctionnels des protéines Hox.**

La caractéristique principale des protéines Hox est l'homéoboîte. Ce domaine hautement conservé est composé d'une soixantaine d'acides aminés adoptant une structure tridimensionnelle hélice - tour - hélice formée de quatre hélices alpha. Cette structure est impliquée dans la reconnaissance et la liaison d'une séquence consensus sur l'ADN (5'-T<sub>1</sub>N<sub>2</sub>A<sub>3</sub>T<sub>4</sub>(G/T)<sub>5</sub>(G/A)<sub>6</sub>-3'). Sur les protéines Hox, on retrouve aussi, en amont de l'homéoboîte, une autre séquence composée de 4 à 7 acides aminés appelée motif YPWM ou homéopeptide. Cette séquence conservée est nécessaire à la dimérisation des protéines Hox avec la protéine Pbx et permet l'interaction indirecte, via Pbx, des protéines Hox avec les protéines Meis et Prep. En N-terminal, un autre domaine hautement conservé est retrouvé (MSSLLYY-N). Ce domaine protéique est impliqué dans l'hétérodimérisation des gènes Hox avec certains co-facteurs. La section C-terminale est très acide et sa fonction est encore inconnue. La partie inférieure du schéma représente une image tridimensionnelle d'un ADN double brin sur lequel se retrouve lié les hélices  $\alpha$  des homéoboîtes d'une protéine Hox et de son co-régulateur Pbx-1.



protéine à homéoboîte. L'interaction entre ces deux protéines modifie l'activité des protéines Hox dimérisées (Ferretti *et al.*, 2000). PBX permet aussi aux protéines Meis et Prep d'interagir indirectement avec les protéines Hox afin d'en moduler l'action (Ferretti *et al.*, 2000). Cependant, Meis a aussi la capacité de moduler l'activité des protéines Hox indépendamment de PBX, suggérant que Meis peut interagir avec les protéines Hox de façon directe ou de façon indirecte via un cofacteur à déterminer (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Deux modes d'interactions sont présentement proposés soient la formation d'un hétérotrimère via deux régions de reconnaissance de Pbx avec Meis (ou Prep) et Hox, ou la formation de deux dimères indépendants ayant une action complémentaire (Pbx-Hox et Pbx-Meis (ou Prep); Vlachakis *et al.*, 2001; Ferretti *et al.*, 2000). Cependant, plusieurs évidences indiquent que la formation d'un hétérotrimère serait favorisée (Vlachakis *et al.*, 2001). Il semble que la présence de Meis ou Prep est nécessaire pour assurer ou inhiber la fonction transcriptionnelle de certaines protéines Hox (Selleri *et al.*, 2001; Thorsteinsdottir *et al.*, 2001; Calvo *et al.*, 1999; Krosel *et al.*, 1998).

En second lieu, la région N-terminale (figure 6) est aussi hautement conservée chez les protéines Hox. Cette zone est également impliquée dans l'hétérodimérisation des protéines Hox avec certains co-facteurs.

#### **1.4.3 Distribution des gènes *Hox* dans le génome et leur expression dans l'embryon.**

Chez les mammifères, la famille des gènes *Hox* est constituée de 39 membres distribués sur quatre chromosomes différents (Cillo *et al.*, 1999; Flagiello *et al.*, 1997).

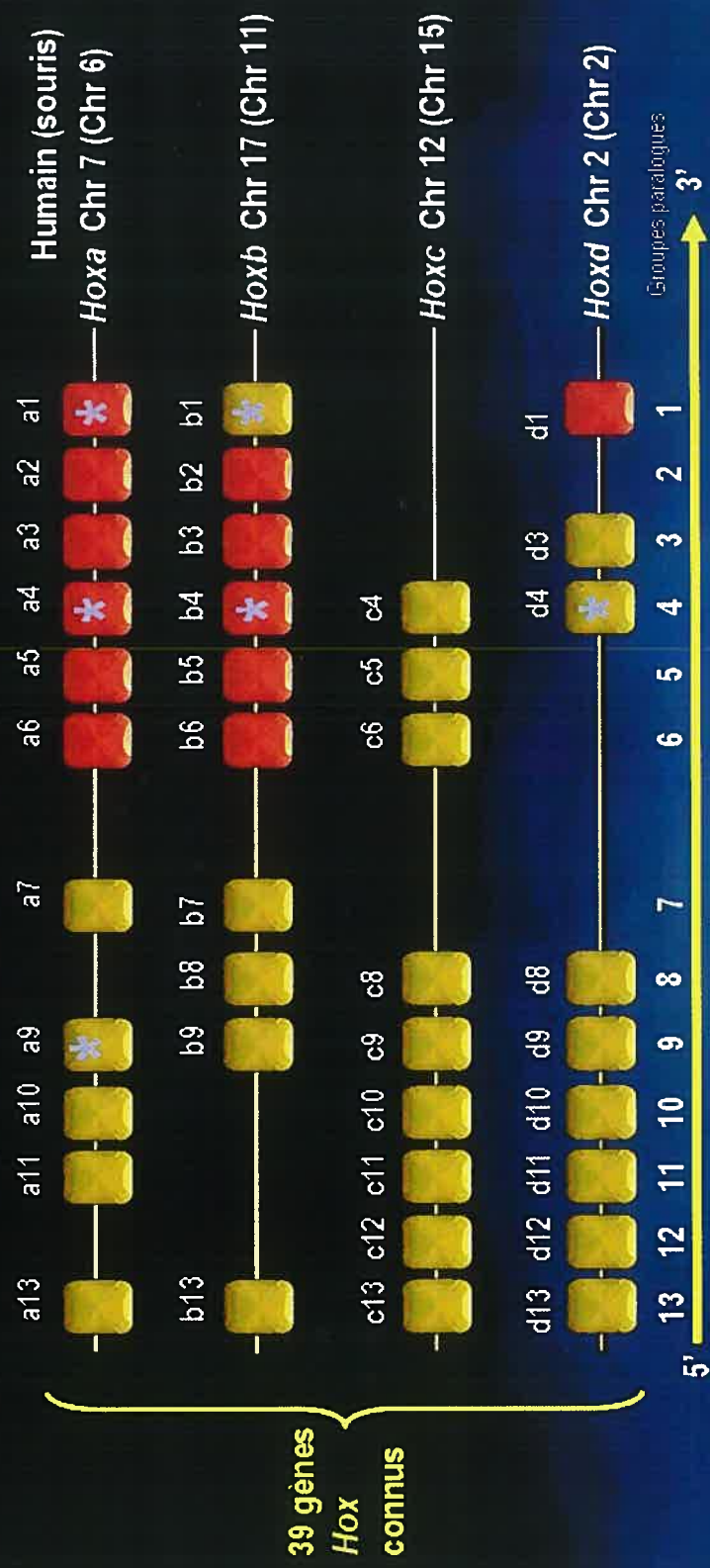
Chez l'humain, les quatre complexes ainsi formés sont appelés HOXA, HOXB, HOXC et HOXD et sont situés respectivement sur les chromosomes 7, 17, 12 et 2 (Figure 7; Cillo *et al*, 1999; Flagiello *et al*, 1997; Le Moigne, 1997). Une des caractéristiques principales de l'organisation de tous les gènes *Hox* est leur similitude au niveau de l'arrangement et de l'homologie des gènes *Hox* constituant les différents complexes sur l'ADN. Ces homologies ont permis de diviser les gènes *Hox* en groupes paralogues (figure 7). Ainsi, HOXA1 est très homologue à HOXB1 et HOXD1, tandis que HOXA2 est homologue à HOXB2 et à HOXD2, et ainsi de suite. Les membres d'un même groupe paralogue peuvent jouer des rôles biologiques similaires et leurs protéines HOX sont exprimées sensiblement aux mêmes endroits durant l'embryogenèse (Le Moigne, 1997). Ces similitudes retrouvées chez ces quatre complexes résulteraient de duplications successives d'un complexe ancestral commun au cours de l'évolution, (Le Moigne, 1997). Lors de l'embryogenèse, les gènes *Hox* des différents complexes paralogues sont exprimés selon un patron spatio-temporel similaire. En fait, dans l'embryon, les gènes *Hox* situés en 3' des complexes *Hox* vont être exprimés plus précocément dans les zones antérieures de l'embryon tandis que les gènes situés en 5' de ces complexes seront exprimés tardivement et dans les zones postérieures de l'embryon (Le Moigne, 1997). Il est aussi important de mentionner que les gènes situés en 3' des complexes répondent fortement à l'acide rétinoïque contrairement aux gènes situés en 5' qui répondent peu ou pas à l'acide rétinoïque (Le Moigne, 1997). Rappelons finalement que les gènes *Hox* participent, lors des stades précoces de l'embryogenèse, à la formation de l'axe antéro-postérieur et proximo-distal (Le Moigne, 1997). L'acide rétinoïque est l'un des facteurs ayant la capacité d'activer la

**Figure 7: Localisation et organisation génique des gènes *Hox* chez les mammifères.**

Les 39 gènes *Hox* sont distribués en quatre complexes appelés HOXA, HOXB, HOXC et HOXD. Chaque complexe se retrouve sur un chromosome différent dans le génome humain tel qu'indiqué à droite de la figure. Les chromosomes correspondant chez la souris sont indiqués entre parenthèses. Les gènes *Hox* sont distribués en groupes paralogues (1, 2, 3, etc...) selon leur disposition le long des complexes et leur homologie. Les groupes paralogues retrouvés en 3' des complexes *Hox* sont exprimés plus précocément au cours du développement embryonnaire comparativement à ceux retrouvés en 5' des complexes. Les gènes *Hox* des groupes paralogues situés en 3' des complexes sont exprimés dans les zones les plus antérieures de l'embryon alors que ceux retrouvés en 5' sont exprimés dans les zones plus postérieures de l'embryon. Les gènes *Hox* situés en 3' des complexes répondent fortement à l'AR contrairement aux gènes situés en 5' qui répondent peu ou pas à l'AR. \* Indique les gènes *Hox* dont le promoteur contient un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE; *Hoxa-1*, *Hoxa-4*, *Hoxa-9*, *Hoxb-1*, *Hoxb-4* et *Hoxd-4*). Ces gènes sont directement contrôlés par l'acide rétinoïque.



# Gènes Hox exprimés dans le poumon de la souris adulte



Exprimés tardivement durant l'embryogenèse et dans les régions postérieures de l'embryon.  
La réponse aux rétinoïdes est faible.

\*

Gènes Hox contenant des éléments de réponse à l'acide rétinoïque

Exprimés tôt durant l'embryogenèse et dans les régions antérieures de l'embryon.  
La réponse aux rétinoïdes est forte.

transcription des gènes *Hox* situés en 3' des différents complexes. À leur tour, les produits de ces gènes activeront en cascade la transcription des gènes *Hox* suivants situés en 5' des complexes et ainsi de suite.

#### 1.4.4 Régulation des gènes *Hox*.

Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *Hox* sont complexes. Par exemple, leur organisation particulière dans les complexes homéotiques permet un partage des éléments de réponse entre gènes adjacents tel que le démontre l'exemple des gènes *Hoxb-4* et *Hoxb-5* (Gould *et al.*, 1997). Lorsqu'un activateur lie l'élément de réponse situé entre les deux gènes, la transcription de ces gènes sera modulée en même temps. Les gènes *Hox* ont aussi la capacité de s'autoréguler, comme c'est le cas du gène *Hoxb-1* (figure 8). Le produit du gène *Hoxb-1*, en collaboration avec le cofacteur Pbx, permet de maintenir sa propre expression via un élément d'autorégulation (ARE; figure 8; Di Rocco *et al.*, 1997; Popperl *et al.*, 1995). Les gènes *Hox* ont aussi la capacité d'activer d'autres gènes *Hox* situés sur un même complexe (régulation *cis*) ou situés sur un autre complexe (régulation *trans*). Ainsi, *Hoxa-1* et *Hoxa-2* ont la capacité d'activer, en coopération avec Pbx, la transcription de *Hoxb-1* via l'élément de réponse ARE (figure 8; Di Rocco *et al.*, 1997).

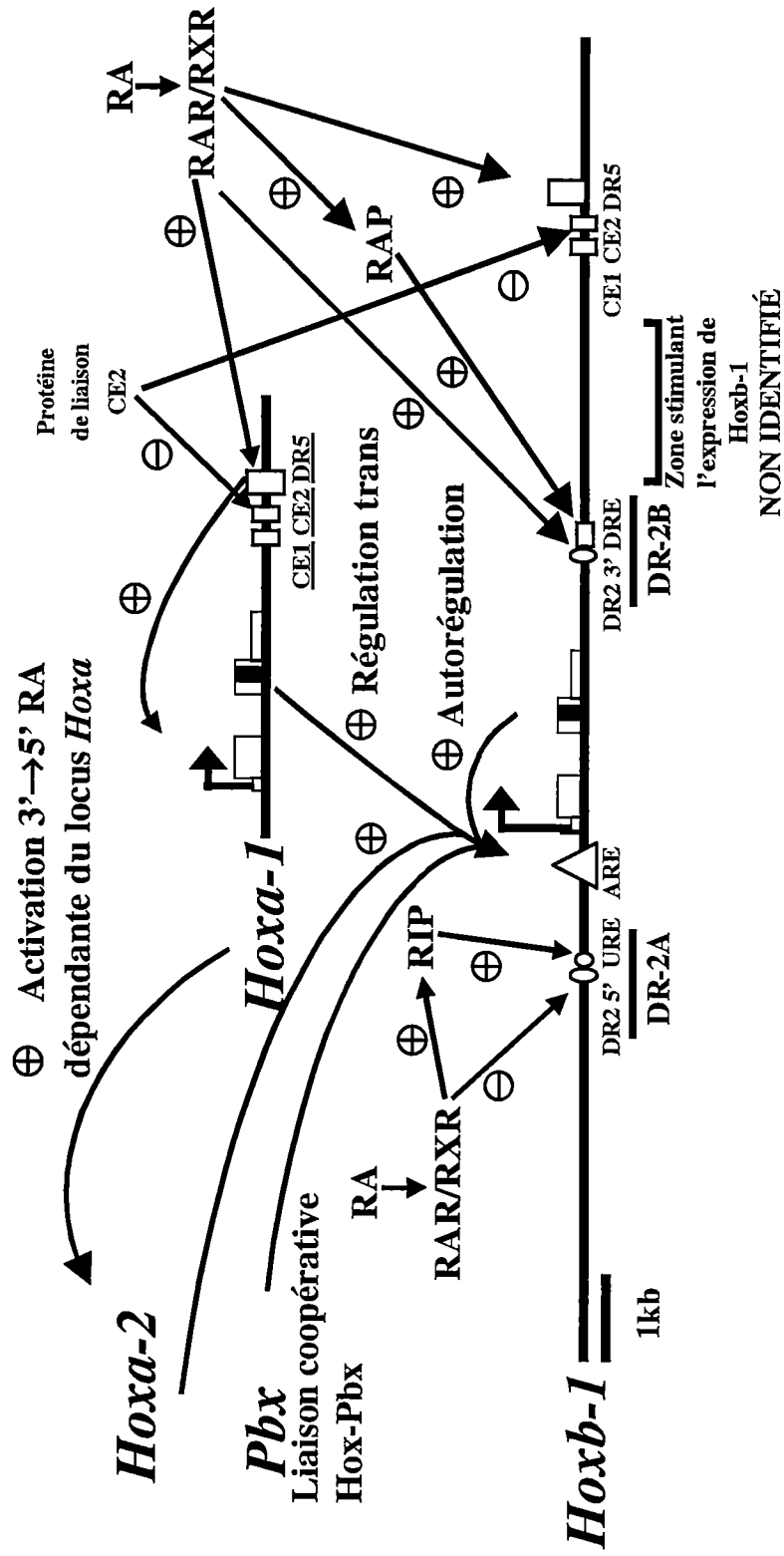
Les gènes *Hox* peuvent être régulés par des facteurs de transcription autres que les protéines *Hox*. Par exemple, les promoteurs des gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-4*, *Hoxa-9*, *Hoxb-1*, *Hoxb-4* et *Hoxd-4* contiennent des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (figure 8; Langston et Gudas, 1992; Langston *et al.*, 1997; Packer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1996; Popperl et Featherstone, 1993; Ogura et Evans, 1995;

**Figure 8 : Régulation transcriptionnelle des gènes *Hox*. Exemple de la régulation de *Hoxb-1*.**

L'acide rétinoïque contrôle directement l'expression de *Hoxb-1* via trois éléments de réponse à l'AR (DR-2 5', DR2 3' et DR5). L'AR induit l'expression de corégulateurs positifs tissus spécifiques appelés RIP (protéine inductible par les rétinoïdes) pour le DR2 5' et RAP (protéine activatrice des rétinoïdes) pour le DR2 3'. Ces co-régulateurs lient respectivement des éléments de réponse appelés URE (élément de réponse en amont) et DRE (élément de réponse en aval). L'activation via le DR5 peut être réprimée partiellement par l'expression AR dépendante d'un co-régulateur négatif se liant à l'élément de réponse CE2 (élément conservé). Cet élément de réponse ainsi que CE1 et DR5 se retrouvent aussi en 3' du gène *Hoxa-1*. Le produit du gène *Hoxb-1*, en collaboration avec la protéine Pbx, permet le maintien de sa propre expression déclenchée par l'AR via un élément d'autorégulation appelée ARE (élément auto-régulateur). L'expression AR-dépendante de *Hoxa-1*, via son propre DR5, est impliquée dans la régulation *trans* de *Hoxb-1* et participe au maintien de son expression. L'acide rétinoïque provoque également l'activation séquentielle des gènes Hox situés en 5' de *Hoxa-1*. Cette activation AR-dépendante de *Hoxa-2* participe à son tour au maintien de l'expression de *Hoxb-1*.

⊕ : Régulation positive.

⊖ : Régulation négative.



Gould *et al.*, 1998). L'expression de ces gènes *Hox* peut alors être directement contrôlée par l'AR et par la disponibilité des différents récepteurs à l'acide rétinoïque.

#### 1.4.5 Rôles des gènes *Hox* au stade adulte.

Depuis maintenant quelques années, il a été remarqué que certains gènes *Hox* sont exprimés au stade adulte de façon tissu spécifique. Par exemple, au niveau des poumons chez l'humain, les gènes *HOXA2* à *HOXA6*, les gènes *HOXB2* à *HOXB6* et *HOXD1* sont exprimés (Cillo, 1995; Kappen, 1996). Le rôle joué par ces gènes au niveau du poumon adulte est pratiquement inconnu. Cependant, ils pourraient participer au contrôle de l'expression de certaines des protéines du surfactant pulmonaire chez les pneumocytes de type II et les cellules Clara en contrôlant l'expression de la protéine TTF-1 (Guazzi *et al.*, 1994; Whitsett et Glasser, 1998) et ils peuvent aussi influencer la prolifération cellulaire (Krosl et Sauvageau, 2000; Bromleigh et Freedman, 2000; krosl *et al.*, 1998), la différenciation cellulaire (Bromleigh et Freedman, 2000; Komuves *et al.*, 2000; Fujino *et al.*, 2001), l'apoptose (Izon *et al.*, 1998) et l'angiogenèse (Boudreau *et al.*, 1997). Par exemple, l'expression des gènes codant pour p53 (Raman *et al.*, 2000), la cycline D1 (Krosl et Sauvageau, 2000), p21waf (Bromleigh et Freedman, 2000), l'intégrine  $\beta 3$  (Boudreau *et al.*, 1997), la vimentine (Benazzouz et Duprey, 1999) et l'ostéopontine (Shi *et al.*, 2001) peuvent être régulés, directement ou indirectement, par les protéines *Hox*. Par ailleurs, l'expression de certains gènes *Hox* peut être modulée lors de l'angiogenèse, comme c'est le cas de *Hoxd-3* dont l'expression est augmentée suite à une stimulation des cellules endothéliales (HUVEC) par bFGF

(Boudreau *et al.*, 1997). Finalement, les gènes *Hox* sont aussi soupçonnés d'être impliqués dans la tumorigenèse.

#### **1.4.6 Implication des gènes *Hox* dans la tumorigenèse.**

La première indication de l'implication possible des gènes *Hox* dans la tumorigenèse est survenue lors de la découverte d'une délétion sur le chromosome 2 chez la souris dans des cas de leucémies myéloïdes. Cette délétion impliquant le gène de *Hoxd-3* suggère fortement que ce gène est impliqué dans ce type de leucémie (Blatt et Sachs, 1988). Au courant de la même année, toujours dans certains cas de leucémies myéloïdes chez la souris, un réarrangement chromosomique impliquant le gène *Hoxb-8* a été remarqué. Lors du réarrangement chromosomique, l'insertion d'une séquence appelée IAP (« internacisternal particule A ») en amont de *Hoxb-8* rend son expression constitutive (Kongsuwan *et al.*, 1989; Blatt *et al.*, 1988). Le potentiel oncogénique de *Hoxb-8* a été démontré par des essais de transformation cellulaire. En effet, *Hoxb-8* a la capacité d'augmenter fortement la prolifération cellulaire et d'induire un changement de morphologie des cellules NIH3T3 ainsi transformées par le gène *Hoxb-8* (Aberdam *et al.*, 1991). *Hoxb-8* a aussi la capacité de transformer des cultures primaires de cellules de la moelle osseuse. Ces cellules, lorsqu'injectées dans des souris réceptrices induisent des leucémies (Perkins et Cory, 1993; Perkins *et al.*, 1990).

Chez l'humain, plusieurs études ont révélé, dans des lignées cellulaires hématopoïétiques (issues de leucémies), que le patron d'expression des gènes *Hox* varie au cours des différents stades d'évolution des leucémies (Celetti *et al.*, 1993; Magli *et al.*, 1991). Des études ultérieures ont finalement démontré l'implication de *HOXA-10*

dans les leucémies AML (leucémies aiguës myéloblastiques; Thorsteinsdottir *et al.*, 1997; Lawrence *et al.*, 1995) et de HOXA-9 et HOXB-3, en collaboration avec MEIS1, dans les leucémies AML (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001).

Dans plusieurs types de cancers humains tel les cancers pulmonaires (Tiberio *et al.*, 1994), les cancers colorectaux (De Vita *et al.*, 1993; Vider *et al.*, 2000), les cancers rénaux (Cillo *et al.*, 1992) et les cancers du sein (Chariot et Castronovo, 1996), l'expression des gènes *Hox* est aberrante. Ces gènes peuvent ainsi être surexprimés, sous-exprimés, perdus ou être exprimés de façon ectopique. Étant donné les effets divers des gènes *Hox* sur la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse, les gènes *Hox* ainsi dérégulés dans leur expression pourraient jouer un rôle important dans le développement de ces types de cancers.

Finalement, des essais de transformation cellulaire ont révélé le caractère oncogénique de la surexpression de *Hoxa-9* (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001), *Hoxb-3* (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001; Krosi *et al.*, 1998), *Hoxb-4* (Krosi et Sauvageau, 2000; Krosi *et al.*, 1998), *Hoxb-8* (Perkins et Cory, 1993; Aberdam *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1990), ainsi que pour *Hoxa-1*, *Hoxa-5*, *Hoxa-7*, *Hoxb-7* et *Hoxc-8* (Maulbecker et Gruss, 1993). Ces essais ont montré que ces gènes induisent une forte augmentation de la prolifération cellulaire, une augmentation de la capacité des cellules à former des colonies dans de l'agar mou ou encore d'induire l'apparition de tumeurs lorsque ces cellules sont injectées dans des souris nues.

En résumé, plusieurs gènes *Hox* démontrent un potentiel oncogénique. De plus, des dérèglements de l'expression de certains gènes *Hox* ont été rapportés dans plusieurs cancers humains, dont les cancers pulmonaires. Rappelons que les gènes *Hox* sont

directement, ou indirectement, contrôlés par les récepteurs à l'AR. Nous posons donc l'hypothèse qu'au niveau des cancers pulmonaires, les gènes *Hox* sont des cibles importantes affectées par l'expression inadéquate des diverses isoformes de RAR $\beta$  durant le processus de tumorigenèse.



## **2. Hypothèse de travail.**

L'équipe du Dr Jacques Bérard a démontré l'implication des différentes isoformes du récepteur nucléaire RAR $\beta$  dans la tumorigénèse pulmonaire par la surexpression de l'isoforme RAR $\beta$ 4 ou la diminution de l'expression des isoformes RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 3 dans différents modèles de souris transgéniques. Les isoformes RAR $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 sont considérées comme des isoformes suppresseurs de tumeurs. La diminution de leur expression entraînerait une augmentation de la susceptibilité des cellules à devenir cancéreuses et causerait ainsi une augmentation de l'incidence d'apparition de tumeurs pulmonaires. L'isoforme RAR $\beta$ 4 est considérée comme une isoforme à caractère dominant négatif puisqu'elle est dépourvue de la fonction de transactivation AF-1 contenue normalement dans le domaine A absent chez cette isoforme. Lorsqu'elle est surexprimée, elle compétitionnerait entre autres avec les isoformes RAR $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3. Elle empêcherait donc ces derniers de jouer leurs rôles de suppresseurs de tumeurs. Ainsi, lorsque l'expression de RAR $\beta$ 4 est augmentée, une augmentation de la susceptibilité des cellules à devenir cancéreuse peut survenir.

Nous proposons de poursuivre cette étude afin de déterminer le mécanisme de tumorigénèse enclenché suite au dérèglement de l'expression des différentes isoformes de RAR $\beta$ . Mon projet de recherche consiste à vérifier l'hypothèse que l'expression des gènes *Hox* est affectée en réponse au dérèglement de l'expression des isoformes de RAR $\beta$  ce qui contribue au processus de tumorigénèse pulmonaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, je propose de répondre aux deux questions suivantes : premièrement, déterminer par microscopie confocale que les gènes *Hox* sont dérégulés dans leurs expressions lors du processus de la tumorigénèse pulmonaire chez des modèles de souris transgéniques ayant une surexpression de l'isoforme RAR $\beta$ 4 ou

une perte de l'expression des isoformes RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 3. En deuxième lieu, déterminer si le changement de l'expression des gènes *Hox* influence le processus de la tumorigenèse pulmonaire en transfectant de façon transitoire des pneumocytes de type II mis en culture primaire avec des vecteurs d'expression des gènes *Hox* qui nous intéressent. Les pneumocytes de type II seront extraits et purifiés à partir de poumon de souris témoins ou transgéniques selon une technique que je mettrai au point.

### **3. Matériels et Méthodes.**

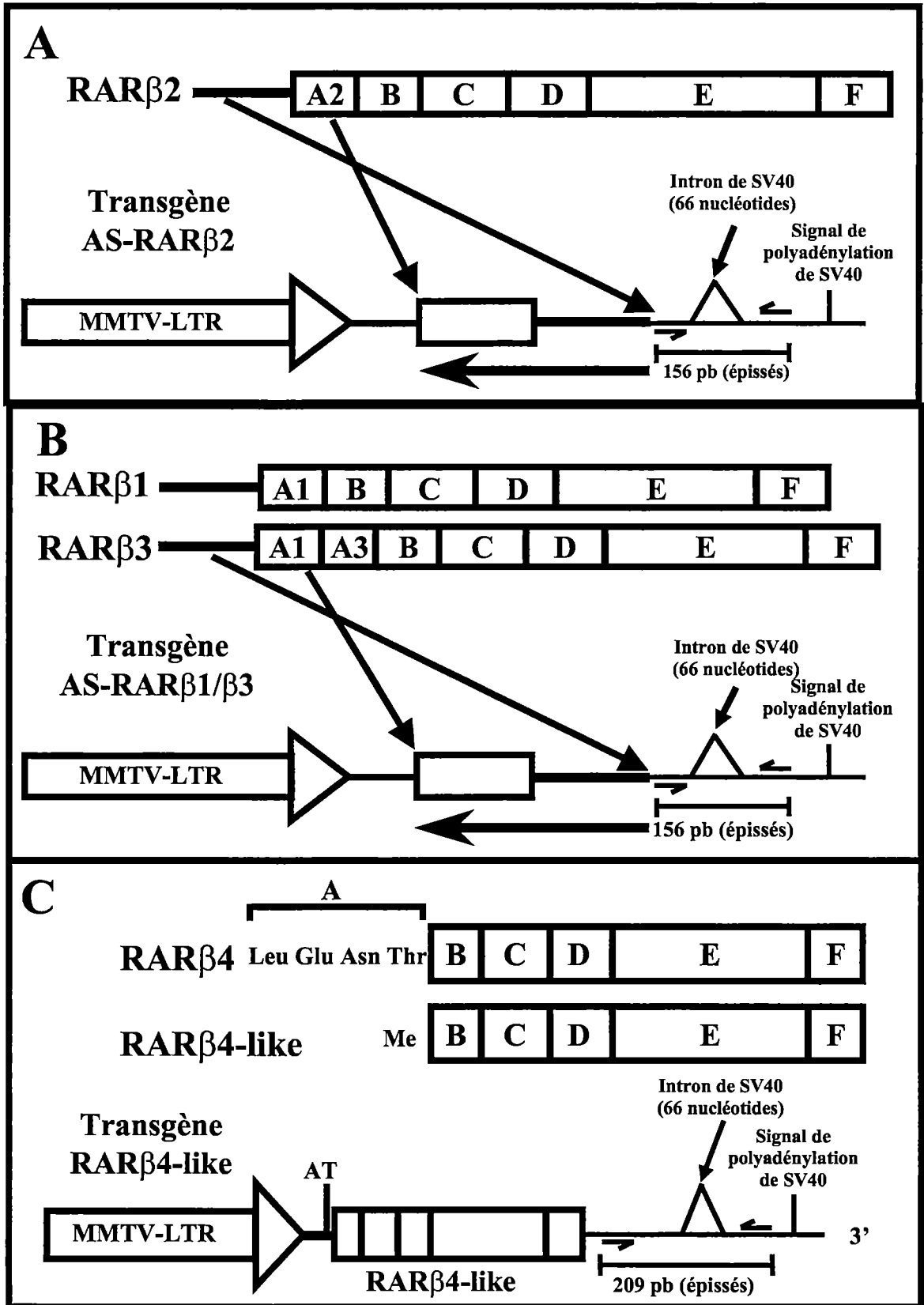
### 3.1 Modèles animaux.

L'équipe du Dr. Bérard a conçu différents modèles animaux de souris transgéniques afin d'étudier l'implication des différentes isoformes de RAR $\beta$  dans la tumorigénèse pulmonaire. Afin de diminuer l'expression des isoformes RAR $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 chez la souris, des constructions antisens sous le contrôle du promoteur exogène MMTV-LTR ont été générées. Cinq lignées de souris transgéniques ont ainsi été générées : les lignées 422, 426 et 432 exprimant une ou plusieurs copies du transgène AS-RAR $\beta$ 2 (ciblant l'isoforme RAR $\beta$ 2; figure 9A) et les lignées de souris 1002 et 1003 exprimant une ou plusieurs copies du transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 (ciblant les isoformes RAR $\beta$ 1 et  $\beta$ 3; figure 9B). Dans ces lignées de souris transgéniques, l'expression des isoformes RAR $\beta$ 1 et RAR $\beta$ 3, et de l'isoforme RAR $\beta$ 2 est diminuée considérablement par la présence des ARN antisens (Bérard *et al.*, 1997; Bérard *et al.*, 1996).

L'isoforme RAR $\beta$ 4 est surexprimée dans les lignées de souris 32 et 5005. Ces lignées portent une ou plusieurs copies du transgène RAR $\beta$ 4-like sous le contrôle du promoteur MMTV-LTR (figure 9C; Bérard *et al.*, 1994). Le transgène de cette construction produit un ARMm semblable à celui de RAR $\beta$ 4 sauf que le codon d'initiation est un codon méthionine au lieu d'un codon leucine facilitant ainsi la traduction de l'ARNm exogène. Il a été suggéré que lorsque présent, RAR $\beta$ 4 pourrait entrer en compétition avec les isoformes RAR $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 ainsi que les autres RAR (les isotypes RAR $\alpha$  et RAR $\delta$  incluant leurs isoformes respectives) et empêcherait celles-ci de remplir leur rôle suppresseurs de tumeurs en compétitionnant avec les éléments de réponse de type RARE.

**Figure 9: Description des transgènes contenus dans les modèles animaux AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.**

(A) une portion de l'ADN commune aux domaines A de l'isoforme RAR $\beta$ 2 a été inversée et insérée en aval du promoteur MMTV-LTR. Le transgène produit un ARN antisens dirigé spécifiquement contre le domaine A de l'isoforme RAR $\beta$ 2. L'expression de la protéine RAR $\beta$ 2, en présence de l'antisens, est considérablement diminuée (Bérard *et al.*, 1996). (B) une portion de l'ADN commune aux domaines A des isoformes RAR $\beta$ 1 et RAR $\beta$ 3 a été inversée et insérée en aval du promoteur MMTV-LTR. Le transgène produit un ARN antisens dirigé spécifiquement contre le domaine A de ces deux isoformes. L'expression des isoformes RAR $\beta$ 1 et RAR $\beta$ 3, lorsque l'antisens est présent, est fortement diminuée (Gagné *et al.*, en préparation). (C) le transgène RAR $\beta$ 4-like est constitué d'un ADNc de RAR $\beta$ 4 avec une méthionine comme codon d'initiation au lieu d'un codon leucine. Cet ADNc a été inséré en aval du promoteur MMTV-LTR ce qui cause sa surexpression dans les tissus répondants aux glucocorticoïdes.



### 3.2 Identification des souris transgéniques.

Afin de préserver les lignées de souris transgéniques conçues par notre équipe de recherche et d'augmenter le nombre de souris à étudier, nous accouplons les souris transgéniques hémizygote avec des souris non-transgéniques. Ceci permet d'obtenir de nouvelles portées dont seulement la moitié des souris porteront le transgène. A cause de ceci, nous devons donc identifier les souris porteuses du transgène. Pour ce faire, l'ADN est extrait du sang frais de souris obtenu par prélèvement rétro-orbital en mélangeant 200  $\mu\text{L}$  de sang avec 1 mL de la solution de DNazole (Gibco) et 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100%. Le mélange est entreposé à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 13000 g. Le surnageant est enlevé et le culot est dissout dans 150  $\mu\text{L}$  d'une solution fraîche d'hydroxyde de sodium 8 mM ajustée à pH 8.0 et incubé à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes. Cette solution est par la suite centrifugée à 13000 g durant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et mélangé avec 500  $\mu\text{L}$  de phénol : chloroforme (1:1). Le mélange est centrifugé pour une durée de 5 minutes à 13000 g et la phase supérieure est récupérée et mélangée avec une solution chloroforme: alcool isoamylique (24:1). La solution est centrifugée pendant 2 minutes à 13000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 300  $\mu\text{L}$  d'EtOH 95% sont ajoutés avec 15  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3M afin de précipiter l'ADN. La solution est mélangée au vortex et entreposée 20 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La solution est par la suite centrifugée à 13000 g pendant 10 minutes. Le culot est lavé avec 200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70% et finalement dissout dans 20  $\mu\text{L}$  d'hydroxyde de sodium 8 mM ajusté à pH 8.0.

Le transgène des souris transgéniques est identifié par PCR. A cette fin, 10  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADN extrait du sang de chaque souris est mélangée à 90  $\mu\text{L}$  d'une



solution mère. Cette solution est un mélange de dNTP (0.2 mM), de Taq polymérase (0.4 U), de TRIS-HCl (20 mM, pH 8.5), de KCl (50 mM), de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), de Tween 20 (0.1%) et de 100 pmoles d'oligonucléotides 5'-CTCAGGTCGGCCGACTGCGG-3' (s'hybride sur le promoteur MMTV) et 100 pmoles de l'un des trois oligonucléotides suivants (dépendant des souris à analyser): RAR $\beta$ 4 5'-GACGAGCTCAGAGCTGGTACTCTGTGT-3' (Bérard *et al.*, 1994); RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 5'-GAGCACTGGTCCTTCAGTGAAGCCTGAAGC-3' (Bérard *et al.*, 1997); RAR $\beta$ 2 5'-GCTAGCAGTATGCCGGTGCTGCCAT-3' (Bérard *et al.*, 1996). L'amplification de l'ADN se fait en 35 cycles de PCR composés de trois étapes consécutives : 1 minute à 94°C, 1 minute à 54°C et 1 minute à 72°C. Les produits de PCR sont séparés sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium (0.5  $\mu$ g/mL) à voltage constant (150 volts) dans un tampon TAE. Lorsqu'il y a présence d'une bande d'ADN de taille de 250 pb, la souris analysée porte le transgène. Le fragment d'ADN de 250 pb correspond à une portion du transgène amplifiée par la PCR.

### **3.3 Évaluations histologiques des poumons de souris.**

L'incidence des tumeurs pulmonaires est évaluée chez les souris transgéniques par rapport aux souris non transgéniques. Une autopsie est pratiquée sur les poumons de souris âgées de 10 à 14 mois, et une analyse externe du tissu est faite afin de vérifier la présence ou non de tumeurs pulmonaires visibles. Pour une évaluation histologique plus poussée, des coupes du tissu pulmonaire sont préparées. Pour ce faire, les

poumons extraits sont fixés dans une solution de fixation appelée Bouin (acide picrique saturé: paraformaldéhyde 40% : acide acétique glaciale 15:5:1) à 22°C pendant 24 heures et mis en bloc de paraffine selon les méthodes conventionnelles. Les blocs de paraffine sont sectionnés en tranches de 5 µm avec un microtome (AO Spencer, Buffalo, NY). Les tranches seront déposées sur des lames pré-traitées au 3-aminopropyltriethoxy-silane (solution 2% dans du méthanol). Les coupes de poumons sont par la suite colorées à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine Y selon le protocole suivant: 3 x 2 minutes dans du toluène 100%, 3 x 2 minutes dans de l'EtOH 100%, 5 minutes dans l'eau distillée, 5 minutes dans l'hématoxyline de Harris (14 mM hématoxyline, 211 mM aluminium potassium sulfate, 12 mM oxide mercurique rouge, 5% EtOH), 5 minutes dans l'eau distillée, 10 immersions dans l'alcool acide (EtOH 70%, HCl 1%), 2 minutes dans l'eau distillée, 10 immersions dans une solution de carbonate de lithium 0.135 mM, 2 minutes dans l'eau distillée, 2 x 2 minutes dans l'EtOH 100%, 2 minutes dans une solution éosine Y (3.6 mM éosine Y, 80% EtOH), 10 immersions dans EtOH 100% suivis de 2 x 2 minutes dans l'EtOH 100% et 3 x 2 minutes dans du toluène 100%. Les lames sont par la suite séchées à la température de la pièce et montées avec une lamelle et un milieu de montage (1 mg/mL p-phénylène-diamine, 90% glycérol, 10% PBS) placé directement sur le tissu. Les tissus colorés sont observés par microscopie optique afin de déterminer la présence de tumeurs, de dysplasies ou d'hyperplasies. Ces résultats sont confirmés par le docteur Michel Lessard, un pathologiste du Center Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, site Fleurimont.

### 3.4 Immunofluorescence.

Les poumons de souris prélevés sont fixés dans la solution de fixation (bouin) pendant 24 heures, déshydratés, mis en bloc de paraffine, sectionnés en tranches de 5  $\mu\text{m}$ , déposés sur des lames traitées au 3-aminopropyltriéthoxy-silane (solution 2% dans du méthanol) et débarrassés de la paraffine par des trempages dans du toluène 100% durant 5 minutes à quatre reprises, et rincés 3 fois à l'EtOH 100% durant 5 minutes. Les tissus sont par la suite réhydratés selon le protocole suivant: 5 minutes dans l'EtOH 95%, 5 minutes dans l'EtOH 85%, 5 minutes dans l'EtOH 70%, 5 minutes dans l'EtOH 50%, 5 minutes dans l'EtOH 30% suivi par un bain de PBS durant 10 minutes puis 20 minutes dans une solution de chlorure d'ammonium 50 mM et 2 fois 5 minutes dans du PBS. Les tissus sont par la suite traités par une solution de lait en poudre écrémé 5% (p/v) dans du PBS durant 30 minutes et rincés 2 fois pendant 5 minutes dans du PBS. Dans certain cas, afin d'augmenté le signal d'immunofluorescence, les tissus sont incubés 2 fois pendant 5 minutes dans un tampon sodium citrate (10 mM pH 6.0) chauffé à 98°C. Les tissus sont ensuite rincés dans du PBS durant 5 minutes et entreposés pour la nuit dans un bain de PBS à 4°C.

Le marquage des tissus pour les protéines Hox se fait avec des anticorps polyclonaux de lapins obtenus de la compagnie BabCo (distribué par VWR International) selon une dilution 1/200 dans une solution PBS supplémentée de BSA 1% (p/v) pour une période de 2 heures à 20°C. Les lames marquées sont par la suite rinçées 2 fois pour une période de 5 minutes chacune dans du PBS. Les coupes marquées avec l'anticorps primaire sont par la suite incubées durant 45 minutes en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé avec la fluorescéine (FITC; Sigma, St-

Louis, MO) dilué 1/100 dans une solution PBS supplémentée de BSA 1%. Cette étape est suivie de deux rinçages de 5 minutes dans du PBS. Une lamelle est finalement appliquée sur les lames dans un milieu de montage (25% PBS/75% glycérol/1% paraphénylènediamine). Les lames sont entreposées à l'obscurité pendant 24 heures à 4°C afin de permettre une diminution de la fluorescence parasite (bruit de fond).

La détection du signal d'immunofluorescence des protéines Hox a été effectuée sur un microscope confocal (NORAN Instruments Inc, Middleton, WI) équipé d'un microscope inversé Eclipse TE2000 (Nikon) muni d'un objectif à immersion à l'huile 40X (Nikon) et couplé à un laser au krypton/argon. Les échantillons sont excités à 488 nm par le laser à l'argon. La longueur d'onde d'émission maximale du FITC à 520 nm. Les sections optiques ont été collectées à intervalles de 0.50  $\mu\text{m}$  à une ouverture du diaphragme de 10 nm afin de déterminer la section cellulaire où le niveau maximal de fluorescence est retrouvé dans les cellules. Les images digitalisées de 512 x 480 pixels ont été obtenues par moyenne d'intensité après 128 prises d'images et traités par le programme d'INTERVISION (NORAN) sur une station de travail Silicon Graphics O2 (Mountain View, CA). Tous les échantillons à analyser au cours d'une même expérience ont été disposés sur la même lame afin de maintenir les mêmes conditions expérimentales entre les différents échantillons. Plusieurs images ont été recueillies pour chaque échantillon. Afin de faciliter la comparaison visuelle entre les images, une échelle de pseudocouleur suivant une échelle d'intensité de fluorescence allant de 0 à 255 où le noir indique l'intensité minimale du signal de fluorescence et le blanc l'intensité maximale du signal de fluorescence.

Pour le double marquage FITC avec la sonde nucléaire Bobo™-3 iodide (Molecular Probe, Eugene, OR), Les poumons de souris prélevés sont fixés dans la solution de fixation (bouin) pendant 24 heures, déshydratés, mis en bloc de paraffine, sectionnés en tranches de 5  $\mu$ m, déposés sur des lames traitées au 3-aminopropyltriéthoxy-silane (solution 2% dans du méthanol) et débarrassés de la paraffine par des trempages dans du toluène 100% durant 5 minutes à quatre reprises, et rincés 3 fois à l'EtOH 100% durant 5 minutes. Les tissus sont par la suite réhydratés selon le protocole suivant: 5 minutes dans l'EtOH 95%, 5 minutes dans l'EtOH 85%, 5 minutes dans l'EtOH 70%, 5 minutes dans l'EtOH 50%, 5 minutes dans l'EtOH 30% suivi par un bain de PBS durant 10 minutes puis 20 minutes dans une solution de chlorure d'ammonium 50 mM et 2 fois 5 minutes dans du PBS. Les tissus sont par la suite traités par une solution de lait en poudre écrémé 5% (p/v) dans du PBS durant 30 minutes et rincés 2 fois pendant 5 minutes dans du PBS. Dans certain cas, afin d'augmenté le signal d'immunofluorescence, les tissus sont incubés 2 fois pendant 5 minutes dans un tampon sodium citrate (10 mM pH 6.0) chauffé à 98°C. Les tissus sont ensuite rincés dans du PBS durant 5 minutes et entreposés pour la nuit dans un bain de PBS/Triton X100 0.1% pour la nuit à 4°C.

Le marquage des tissus pour les protéines Hox se fait avec une dilution 1/200 dans une solution PBS supplémentée de BSA 1% (p/v) pour une période de 3 heures à 20°C. Les lames marquées sont par la suite rinçées 2 fois pour une période de 10 minutes chacune dans du PBS. Le marquage avec l'anticorps secondaire se fait avec l'anticorps couplé au FITC à une dilution 1/100 en présence de la sonde nucléaire Bobo™-3 à une concentration de 0.1 mM dans une solution PBS supplémentée de BSA

1% pour une durée de 3 heures à l'obscurité. Cette étape est suivie de deux rinçages de 20 minutes dans du PBS. Une lamelle est finalement appliquée sur les lames dans un milieu de montage (25% PBS/75% glycéro/1% para-phénylènediamine). Les lames sont entreposées à l'obscurité pendant 24 heures à 4°C afin de permettre une diminution de la fluorescence parasite (bruit de fond).

La détection du signal d'immunofluorescence pour le double marquage a été effectuée sur le même appareil que pour le simple marquage des protéines Hox. Cependant, la sonde Bobo™-3 est excitée par le laser argon à 568 nm et l'émission est mesurée à plus de 590 nm. Le signal du FITC est pris sur le même intervalle optique que celui du Bobo™-3.

La forme cylindrique des cellules de Clara, leur localisation autour de la lumière des bronches et leur noyau basal permettent facilement leur identification. Les pneumocytes de type II, pour leur part, sont localisée au niveau des alvéoles, ont une forme cuboïdale, un large noyau, un grand volume cytoplasmique et sont facilement différenciables des pneumocytes de type I qui possèdent une forme très allongée et un petit noyau.

### **3.5 Statistiques sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence**

Pour chaque tissu pulmonaire étudié par microscopie confocale, l'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée avec l'aide du logiciel d'analyse INTERVISION 2D (NORAN). Ces données ont été compilées puis la valeur statistique des résultats a été déterminée en utilisant le test ANOVA (analyse de

variance) suivie du test de comparaison multiple de Tukey-Kramer. Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées statistiquement significatives.

### **3.6 Statistiques sur le signal nucléo-cytoplasmique.**

Pour la protéine Hoxb-3 dans les pneumocytes de type II et dans les cellules de Clara, la détermination du Ratio R nucléo-cytoplasmique a été faite selon le protocole établi par Leclerc *et al.* (1998). La fluorescence moyenne a été calculée avec l'aide du logiciel d'analyse INTERVISION 2D (NORAN) sur une station de travail Silicon Graphics O2. Après avoir corrigé les fluorescences nucléaires (N) et cytoplasmique (C) pour la fluorescence causée par le bruit de fond, les résultats ont été exprimés selon  $R = \frac{N - C}{N + C}$ . Ce calcul a plusieurs avantages : il est linéaire allant de  $-1$ , représentant un signal complètement cytoplasmique, à  $+1$  représentant un signal complètement nucléaire, et donne des écarts types pondérés (SD) à travers la fenêtre de valeurs de R et ne dépend pas de la fluorescence absolue puisque les valeurs nucléaires et cytoplasmiques sont normalisées selon leurs sommes. La valeur statistique des résultats a été déterminée en utilisant le test ANOVA (analyse de variance) suivie du test de comparaison multiple de Tukey-Kramer et de Bonferroni. Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées statistiquement significatives.

### **3.7 Purification et mise en culture des pneumocytes de type II.**

Le protocole de purification des pneumocytes de type II pour la culture cellulaire a été adapté selon le protocole établi par Corti *et al.* (1996). Des souris âgées de 4 à 8 mois sont anesthésiées par injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine et

xylazine (87 mg/mL et 13 mg/mL respectivement) avec une dose de 1 mL par kilogramme de masse corporelle. Par la suite, une incision est pratiquée au niveau de l'abdomen et la cage thoracique est enlevée. L'artère du rein gauche est sectionnée pour exsanguiner l'animal et une solution physiologique stérile (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM glucose et 0.2 mM EGTA, pH 7.2) est injectée dans le ventricule droit du cœur afin d'éliminer le sang des poumons. La trachée est par la suite libérée du tissu environnant et un cathéter y est inséré. Ensuite, 2 mL de dispase (Becton Dickinson, Bedford, MA)(50 U/mL), une protéinase dégradant la matrice extra-cellulaire, contenant 0.01% de DNase (Amersham, Montréal) sont injectés dans les poumons via le cathéter. Après une attente de 2 minutes, 450 µL d'une solution liquide d'agarose LMP (agarose à basse température de liquéfaction) 1%, préalablement dissoute à 85°C puis refroidie et maintenue à 42°C, est injectée dans les poumons via le cathéter. De la glace concassée est alors déposée sur les poumons afin de permettre à l'agarose de figer rapidement au niveau des bronches. Les poumons sont par la suite détachés de la cage thoracique et sont incubés pendant 45 minutes à 22°C dans 3 mL de dispase contenant de la DNase 0.01%. Les poumons sont par la suite transférés dans un milieu de culture ayant la composition suivante : DMEM supplémentée de FBS 5%, DNase 0.01%, péniciline (100 U) et streptavidine (100 mg/ml). Les poumons sont alors découpés en petits morceaux de 1 mm<sup>3</sup> avant d'être transférés dans une bouteille stérile contenant un barreau magnétique. La bouteille est fermée hermétiquement et les cellules sont dispersées par agitation pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite récupérées et filtrées successivement sur des membranes de nylon ayant des pores de 100 µm et de 25 µm afin d'éliminer les agrégats cellulaires.



Les cellules sont alors centrifugées à 325 g à la température de la pièce pendant 8 minutes. Le culot cellulaire est récupéré et resuspendu dans 10 mL du milieu de culture.

La purification des pneumocytes de type II se fait en deux étapes. En premier lieu, nous utilisons le système MACS (Miltenyibiotec, Auburn, CA) afin d'enlever la majeure partie des cellules du système immunitaire. Ensuite, afin de soustraire les cellules contaminante restante, une purification par adhérence différentielle est faite.

Pour la première partie de la purification des pneumocytes de type II, les cellules pulmonaires sont resuspendues dans 90  $\mu$ L d'un tampon PBS-BSA (tampon PBS supplémentée de 0,5% (p/v) de BSA) par tranche de 10 millions de cellules, puis 10  $\mu$ L d'un anticorps anti CD-45 couplé à des billes magnétiques du système MACS sont ajoutés à la suspension cellulaire pour chaque tranche de 10 millions de cellules. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à 4°C, puis 10 mL du tampon PBS-BSA est ajouté. La suspension est alors centrifugée à 325 g à la température de la pièce pour une durée de 8 minutes. Les cellules sont resuspendues dans 1 mL du tampon PBS-BSA pour chaque tranche de 10 millions de cellules. La suspension est alors passée sur une colonne du système MACS en présence d'un aimant afin d'éliminer les cellules ciblées par l'anticorps anti-CD-45 (lymphocytes et macrophages pulmonaires). La colonne est rincée 3 fois avec 3 mL du tampon PBS-BSA.

Pour la deuxième étape de la purification des pneumocytes de type II, les cellules récupérées sont centrifugées à 325 g à température pièce pendant 8 minutes et sont resuspendues dans 5 mL du milieu de culture MCDB-201 modifié (milieu MCDB-201 (Sigma, St. Louis, MO) supplémenté de 5 mg/mL d'albumine de sérum de bovin

(BSA) (Sigma), 30 µg/mL de transférine (Sigma), 3 µL/mL de cholestérol riche en lipides (Sigma), 3 µg/mL de cholestérol (Sigma), 1 µg/mL de sphingomyéline (Sigma), 0.2 µg/mL de glutathione (Sigma), 1 µg/mL de dithiothréitol (Sigma), 2.1 µg/mL de phosphoénol pyruvate (Sigma), 0.2 µg/mL d'acétate de vitamine E (Sigma), 9 ng de prostaglandine E (Sigma), 1% de péniciline, 1% de streptomycine et 0.08% de fungizone). La suspension cellulaire est ensuite transférée sur un pétri de 60 mm et mise dans un incubateur durant 1 heure à 37°C avec un mélange 5% CO<sub>2</sub>/95% oxygène et une humidité relative élevée. Le milieu de culture est ensuite récupéré et centrifugé à 325 g à la température de la pièce pendant 8 minutes. Finalement, la suspension cellulaire est diluée dans 5 mL de MCDB-201 modifié, transférée dans un pétri de 60 mm et placée, pour la culture cellulaire, dans un incubateur à 37°C avec un mélange % CO<sub>2</sub>/95% oxygène et une humidité relative élevée.

### **3.8 Analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II purifiés.**

Afin d'analyser l'homogénéité des pneumocytes de type II extraits selon la technique décrite ci-haut, nous vérifions la présence des protéines CC10 et la protéine du surfactant B (SP-B) dans ces cellules avec l'aide d'un cytomètre de flux. La protéine SP-B est à la fois exprimée chez les pneumocytes de type II et chez les cellules de Clara (Phelps et Floros, 1991). Comme les cellules de Clara sont considérées comme étant le contaminant majeur dans les cultures primaires de pneumocytes de type II (Corti *et al.*, 1996; Belinsky *et al.*, 1995), nous devons déterminer la quantité de cellules Clara dans cette culture primaire. Pour ce faire, nous vérifions la quantité de cellules exprimant le

marqueur CC10 (aussi appelé CCSP). La protéine CC10 est uniquement exprimée par les cellules de Clara (Nakajima *et al.*, 1998).

Afin de vérifier la pureté des pneumocytes, nous prélevons 1 million de cellules de la culture primaire des pneumocytes de type II et fixons ces cellules pendant 30 minutes sur glace à 4°C dans une solution fraîche de PBS supplémentée de paraformaldéhyde 0.5% (p/v). Les cellules sont par la suite centrifugées à 325 g pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et incubées pendant 2 heures à la température de la pièce en présence de l'anticorps anti-CC10 ou anti SP-B humain développé chez le lapin (gracieusement offert par le Dr. Whitsett (Cincinnati, OH), dilué 1/200 dans une solution de PBS supplémentée de saponine 0.1%. Après incubation, les cellules sont diluées avec 2 mL de PBS, centrifugées à 325 g pendant 10 minutes à 4°C et lavées avec du PBS. Les cellules sont par la suite incubées pendant 1 heure à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (FITC) à une dilution de 1/100 dans une solution de PBS supplémentée de saponine 0.1%. Suite à cette incubation, les cellules sont diluées avec 2 mL de PBS et centrifugées pour une durée de 10 minutes à 325 g à 4°C. Finalement, les cellules sont lavées avec du PBS et resuspendues dans 200 µL de PBS. Toutes les incubations sont faites à l'obscurité afin d'éviter la dégradation de la sonde FITC par la lumière.

L'expression de CC10 et de SP-B est analysée au moyen d'un cytomètre FACScan et du logiciel CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Le FITC a été excité à 488 nm par un laser à l'argon et l'intensité de la lumière émise par les cellules a été mesurée à 530 nm. L'intensité de fluorescence de chaque cellule a été mesurée par

un amplificateur logarithmique et affichée sur une échelle de 4 unités logarithmiques. Le signal des débris cellulaires a été soustrait des résultats selon des limites définies par les données obtenues sur le détecteur de la lumière en directe (« forward scatter ») et la lumière déviée latéralement (« side scatter »). Afin de déterminer le pourcentage de cellules exprimant CC10 ou SP-B, une limite d'intensité de fluorescence minimale a été définie selon les résultats obtenus sur les cellules uniquement marquées par l'anticorps secondaire (cellules contrôles). Chaque cellule ayant une intensité de fluorescence supérieure à cette valeur est comptée et correspond à un événement. Le nombre d'événements ainsi compté est additionné, et comparé au nombre total d'événements (au dessus et en dessous de la limite d'intensité de fluorescence définie).

### **3.9 Analyse de la distribution des pneumocytes de type II dans le cycle cellulaire.**

L'analyse du cycle cellulaire est faite avec 1 million de cellules prélevées de la culture primaire et centrifugées à 325 g pendant 8 minutes à 4°C. Afin d'améliorer la qualité des résultats lors de l'analyse du cycle cellulaire, une décondensation de la chromatine des cellules que nous voulons analyser est induite. Pour ce faire, un traitement choc est imposé aux cellules vivantes : les cellules sont resuspendues dans 1 mL d'une solution de PBS supplémentée de Triton X-100 0.05% et maintenues à 37°C pendant 20 secondes avant d'être mises sur glace (Vinogradov, 1995). Les cellules sont par la suite fixées pendant 30 minutes suite à l'ajout de 1 mL d'une solution fraîche de PBS supplémentée de paraformaldéhyde pour une concentration finale de 2%. Les cellules sont par la suite centrifugées à 575 g pendant 6 minutes à 4°C. Le surnageant

est enlevé, et les cellules sont incubées pendant 45 minutes sur glace dans une solution de PBS contenant 40  $\mu\text{g/mL}$  d'iodure de propidium et 0.1% de saponine. Les cellules sont par la suite centrifugées à 575 g pendant 6 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec du PBS. Finalement, les cellules sont resuspendues dans un volume final de 200  $\mu\text{L}$  de PBS avant d'être analysées par cytofluorimétrie.

Afin d'analyser le cycle cellulaire, l'intensité de fluorescence émise par l'iodure de propidium (Sigma, St. Louis, MO) au niveau de chaque cellule a été mesurée au moyen d'un cytomètre FACScan et du logiciel CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). L'iodure de propidium a été excité à 488 nm par un laser à l'argon, et l'intensité de lumière émise par les cellules a été mesurée à 585 nm par un amplificateur logarithmique. Les résultats sont affichés sur une échelle de 4 unités logarithmiques. Le signal des débris cellulaires a été soustrait des résultats selon des limites définies par les données obtenues sur le détecteur de la lumière en directe (« forward scatter ») et la lumière déviée latéralement (« side scatter »). Le pourcentage de cellules en phase  $G_0/G_1$ , phase s et phase  $G_2/M$  a été déterminé avec le logiciel ModFit LT (Becton Dickinson, San Jose, CA).

## **4. Résultats**

#### **4.1 Présence de tumeurs chez les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.**

Afin de déterminer le rôle possible des gènes *Hox* dans le processus de tumorigenèse pulmonaire, nous avons utilisé les modèles animaux de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like. Chez ces souris, il y a une forte augmentation de l'incidence d'apparition de tumeurs pulmonaires lorsque l'expression des isoformes de RAR $\beta$  est affectée. La transcription des gènes *Hox* est directement contrôlée par les récepteurs à l'AR (RAR et RXR). Nous pourrions donc vérifier si l'expression des gènes *Hox* est affectée au niveau de ces différents modèles de souris transgéniques et déterminer s'ils sont impliqués dans la tumorigenèse pulmonaire.

Pour déterminer quelles souris sont porteuses du transgène, un génotypage par PCR a été fait sur leur ADN génomique. Les paires d'amorces pour le test PCR ont été choisies afin de détecter spécifiquement le transgène et non le gène RAR $\beta$  endogène chez les souris. Lorsque les souris sont transgéniques, le test PCR sur l'ADN des souris transgéniques produit une bande très nette sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (figure 10).

Il est important d'ajouter que les souris transgéniques exprime spécifiquement leur transgène tel que cela a été vérifié par l'équipe de recherche du Dr. Bérard (résultats non-publiés).

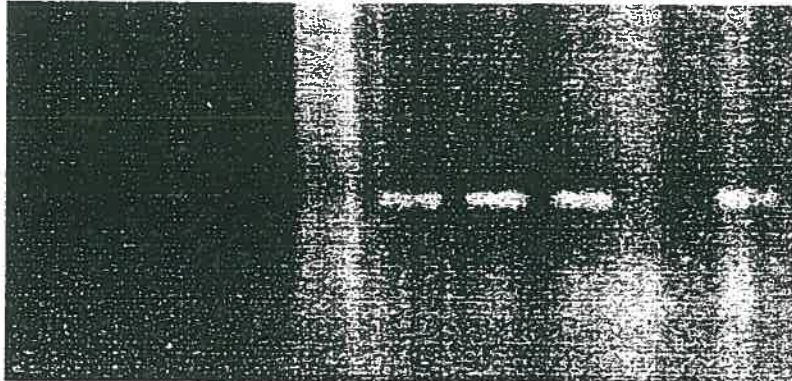
Par ailleurs, nous savons que la présence des transgènes chez les souris transgéniques affecte la synthèse protéique des différentes isoformes de RAR $\beta$ . En effet, les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 montrent une réduction de la

**Figure 10 : Identification des souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 ou RAR $\beta$ 4-like.**

L'ADN de chaque souris est testé individuellement par PCR. Une souris est transgénique lorsqu'il y a présence d'une bande d'environ 250 paires de bases. Les résultats montrent que les souris 5, 6, 7 et 9 porte le transgène AS-RAR $\beta$ 2.



1 2 3 4 5 6 7 8 9



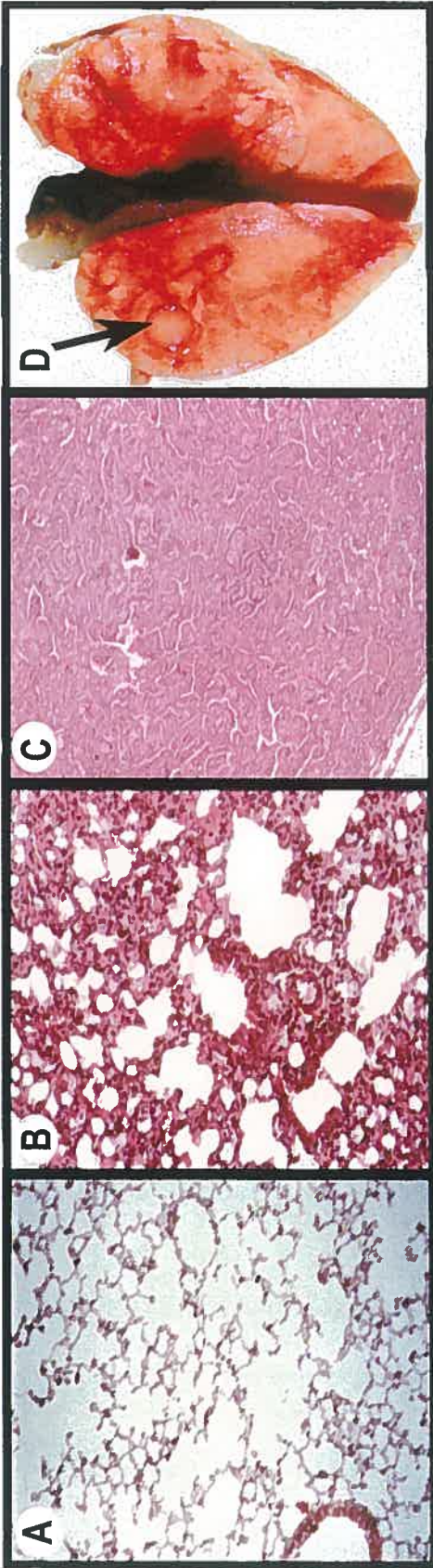
← 250 pb

quantité des récepteurs RAR $\beta$ 1 et RAR $\beta$ 3 (article en préparation) comparé à celui retrouvé chez les souris témoins de même que les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 montrent une diminution de la quantité du récepteur RAR $\beta$ 2 (Bérard *et al.*, 1996). Chez les souris transgéniques porteuses du transgène RAR $\beta$ 4-like, la présence de l'ARNm et une augmentation du signal d'immunofluorescence de RAR $\beta$  suggèrent que l'isoforme RAR $\beta$ 4 est surexprimée (Bérard *et al.*, 1994). Ces résultats indiquent ainsi que les transgènes utilisés sont exprimés dans les différents modèles de souris transgéniques.

A partir de huit mois, les souris sont sacrifiées et une évaluation histologique des poumons est effectuée. Les poumons sont d'abord examinés afin de détecter des tumeurs pulmonaires perceptibles à l'œil (Figure 11 D). Ensuite, les poumons sont fixés dans la solution de Bouin. Des colorations sur les coupes histologiques révèlent chez les souris témoins ou chez les souris transgéniques âgées de moins de 8 mois un épithélium alvéolaire ressemblant à une fine dentelle constituée d'une monocouche de cellules (figures 11 A). Cependant, chez les souris transgéniques âgées de plus de huit mois, des signes évidents d'hyperplasie apparaissent (figure 11 B) et se manifestent par un épaississement des parois alvéolaires. Les pneumocytes de type II, situés dans les alvéoles, et les cellules de Clara, au niveau des bronches, sont parmi les cellules qui prolifèrent. À partir d'environ 10 à 12 mois d'âge, les souris transgéniques commencent aussi à développer des tumeurs pulmonaires (Figure 11 C). À partir de cet âge, des tumeurs peuvent être visibles à la surface des poumons (Figure 11 D). Lors des dissections, les tumeurs sont dénombrées puis analysées par microscopie optique après la coloration à l'hématoxyline/éosine.

**Figure 11 : Examen histologique des poumons provenant de souris témoins ou transgéniques présentant une altération de l'expression des isoformes de RAR $\beta$ .**

A, B et C représentent des colorations hématoxyline/éosine de coupes de tissus provenant de poumons normaux (A), de poumons présentant des symptômes d'hyperplasie (B) et de poumons portant une tumeur pulmonaire (C). (D) poumon fraîchement prélevé d'une souris transgénique portant une tumeur visible à sa surface (flèche). Ce genre de tumeur est souvent observé chez les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.



Le nombre de tumeurs pulmonaires chez les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like est compilé dans le tableau 1. L'incidence d'apparition spontanée des tumeurs pulmonaires pour le total des souris des deux groupes d'âge est très élevée chez les souris transgéniques comparativement aux souris non-transgéniques. En effet, chez les souris transgéniques âgées de 8 à 14 mois (exception faite des souris transgéniques de la lignée 1002 qui ne développent pas de cancers avant l'âge de 14 mois) (tableau 1A), nous remarquons des tumeurs pulmonaires chez 13% des souris de la lignée 1003 (tableau 1A), 62% des souris de la lignée 422, 36% des souris de la lignée 426, 25% des souris de la lignée 432, 33% des souris de la lignée 32 et 35% des souris de la lignée 5005 alors que seulement 2% des souris témoins développent des cancers pulmonaires (tableau 1B). L'incidence de l'apparition de cancers pulmonaires augmente encore plus chez les souris âgées de plus de 14 mois. En effet, nous remarquons une élévation du nombre de souris transgéniques portant des tumeurs ainsi qu'une augmentation du nombre de tumeurs par souris. Le pourcentage de tumeurs chez les souris transgéniques de plus de 14 mois est alors de 78% chez les souris de la lignée transgénique 422, de 53% chez les souris de la lignée transgénique 426, de 33% chez les souris de la lignée transgénique 432, de 41% chez les souris de la lignée transgénique 32, de 45% chez les souris de la lignée transgénique 5005 (tableau 1B), de 54% chez les souris de la lignée transgénique 1002 et de 41% chez les souris de la lignée transgénique 1003 (tableau 1A). Aucune augmentation notable n'est remarquée chez les souris de la lignée témoin. Chez les souris de la lignée 1002, l'augmentation de l'apparition de cancers

**Tableau 1: Incidence d'apparition des tumeurs pulmonaires chez les souris témoins et les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.**

Le tableau A montre la compilation des résultats concernant l'incidence des tumeurs pulmonaires retrouvées chez les souris transgéniques de la lignée exprimant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 (1002 et 1003) comparés à ceux obtenus chez les souris témoins (NTg). Trois groupes d'âges de souris ont été analysés: les souris âgées de moins de 14 mois, entre 14 et 20 mois et entre 20 et 24 mois. Le tableau B montre la compilation des résultats concernant l'incidence de tumeurs pulmonaires retrouvées chez les souris transgéniques des lignées exprimant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 (422, 426 et 432) et chez les souris transgéniques des lignées exprimant le transgène RAR $\beta$ 4-like (32 et 5005) comparés à ceux obtenus chez les souris témoins (NTg). Deux groupes d'âges de souris ont été analysés: les souris âgées entre 8 et 14 mois et celles âgées de plus de 14 mois.

A)

Lignées des souris	Souris âgées entre 10 et 14 mois		Souris âgées entre 14 et 20 mois		Souris âgées entre 20 et 24 mois	
	Souris avec tumeurs / nombre souris analysées	%	Souris avec tumeurs / nombre souris analysées	%	Souris avec tumeurs / nombre souris analysées	%
Ntg	0 / 57	0	1 / 62	2	1 / 58	2
1002	0 / 20	0	14 / 26	54	19 / 30	63
1003	4 / 30	13	19 / 46	41	11 / 21	52

B)

Lignées des souris	Souris âgées entre 8 et 14 mois		Souris âgées de plus de 14 mois	
	Souris avec tumeurs / nombre souris analysées	%	Souris avec tumeurs / nombre souris analysées	%
Ntg	4 / 127	3	4 / 287	1
422	18 / 29	62	58 / 74	78
426	9 / 25	36	30 / 57	53
432	5 / 20	25	11 / 33	33
32	5 / 15	33	15 / 37	41
5005	6 / 17	35	13 / 29	45

pulmonaires se poursuit et peut atteindre jusqu'à 63% des souris âgées entre 20 et 24 mois (tableau 1A).

#### **4.2 Comparaison de l'expression des protéines Hox entre les pneumocytes de type II, les cellules de Clara et les cellules cancéreuses chez des modèles de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like et des souris témoins.**

Nous avons vérifié l'expression des protéines Hox par immunofluorescence et microscopie confocale au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara chez les souris témoins et transgéniques, ainsi qu'au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques. Les souris témoins et transgéniques utilisées pour cette expérience étaient âgées entre 14 et 20 mois. Nous nous sommes aussi assurés de la présence de tumeurs dans les tissus analysés (pour les tissus provenant de souris transgéniques) afin de pouvoir vérifier l'expression des protéines Hox dans ces tumeurs.

L'expression des protéines Hoxb-2, Hoxb-3 et Hoxb-4 dans les poumons des souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like ainsi que chez des souris témoins a été analysée par immunofluorescence et microscopie confocale. Dans certaines études, nous avons aussi localisé les noyaux des cellules étudiées avec l'aide de la sonde Bobo3<sup>TM</sup> afin de déterminer s'il y avait relocalisation du signal des protéines Hox au niveau nucléaire.



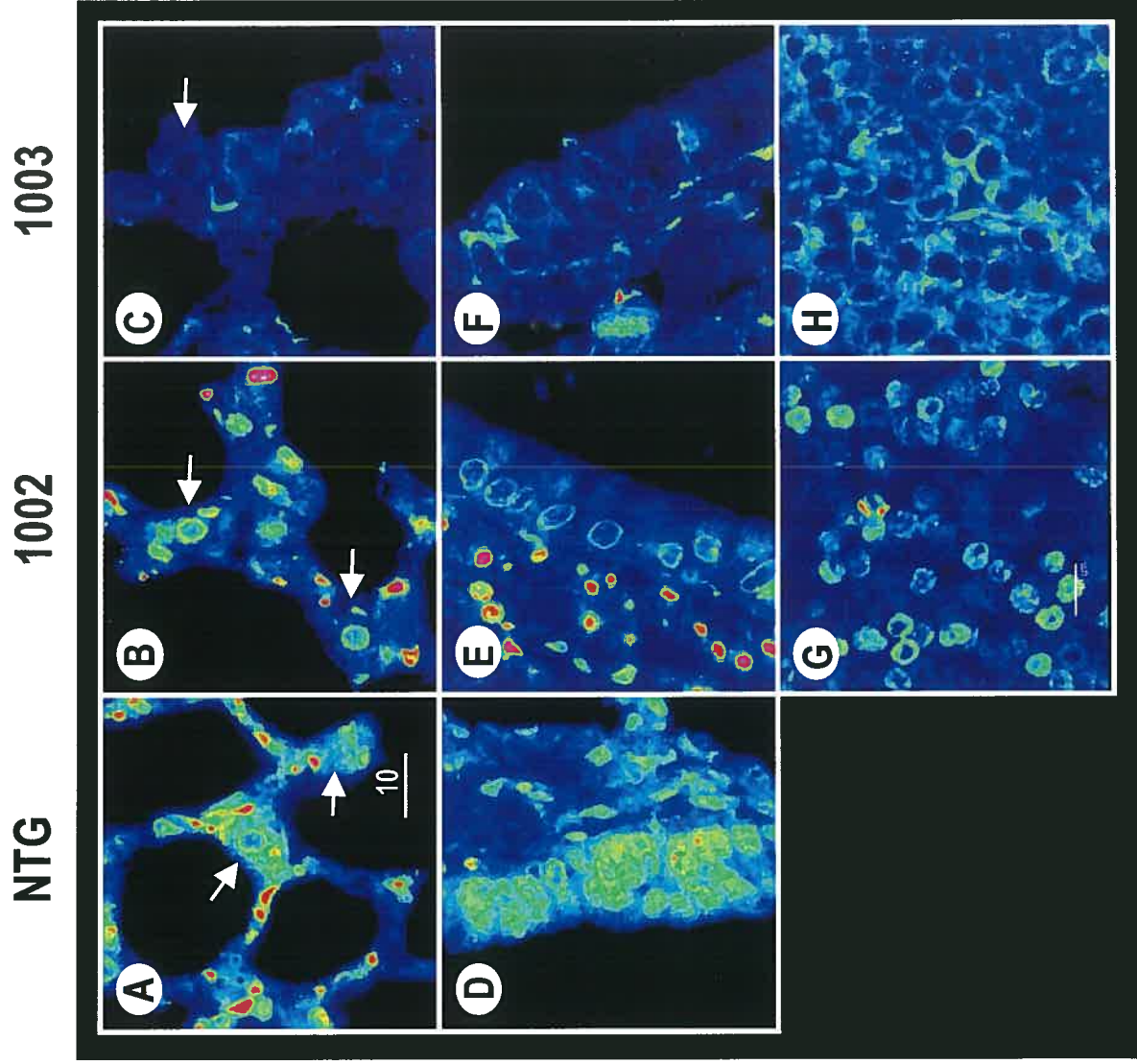
#### **4.2.1 Expression de la protéine Hoxb-2 dans les poumons des souris transgéniques et témoins.**

La détermination de l'expression relative de la protéine Hoxb-2 a été faite dans les poumons des lignées de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 (souris des lignées 1002 et 1003), AS-RAR $\beta$ 2 (souris des lignées 422, 426 et 432) et RAR $\beta$ 4-like (souris des lignées 32 et 5005) par immunofluorescence et microscopie confocale. La protéine HOXB-2 humaine a une masse moléculaire de 38 KDa et elle est exprimée au niveau des poumons chez l'humain adulte (Kappen, 1996; Cillo, 1995). La protéine Hoxb-2 est aussi exprimée au niveau des poumons chez la souris naissante (Bogue *et al.*, 1994; Kappen, 1996). La protéine Hoxb-2 est détectée avec l'aide d'un anticorps de lapin polyclonal (BabCo, distribué par CanLab, Canada).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-2 chez les souris transgéniques de la lignée AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 sont exposés à la figure 12. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 2. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 est de  $100 \pm 14$  (n = 12) au niveau des cellules de Clara et de  $94 \pm 17$  (n = 4) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 2). Chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 est, dans l'ordre respectif, de  $70.5 \pm 9.1$  (n = 11) et de  $44 \pm 11$  (n = 4) dans les cellules de Clara, de  $67.6 \pm 5.5$  (n = 8) et de  $31.1 \pm 8.6$  (n = 5) dans les pneumocytes de type II et finalement de

**Figure 12 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3.**

L'anticorps anti-Hoxb-2 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et D) et transgéniques des lignées 1002 (B, E et G) et 1003 (C, F et H) au niveau des pneumocytes de type II (A, B et C), des cellules de Clara (D, E et F) et des tumeurs pulmonaires (G et H). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Pneumocytes  
de type II**

**Cellules de  
Clara**

**Tumeurs**

**Tableau 2 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 1002 et 1003 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.344, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	12	NA	NA
		Intensité moyenne	100		
		Écart à la moyenne	14		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	4	NA
		Intensité moyenne		94	
		Écart à la moyenne		17	
Souris transgénique 1002	cellules de Clara	<i>n</i>	11	NA	significatif
		Intensité moyenne	70,5		
		Écart à la moyenne	9,1		
		$\Delta I$	29,75		
		<i>q</i>	10,59		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	8	significatif
		Intensité moyenne		67,6	
		Écart à la moyenne		5,5	
		$\Delta I$		26,23	
		<i>q</i>		6,365	
	Tumeurs	<i>n</i>	6	6	significatif
		Intensité moyenne	58,8	58,8	
		Écart à la moyenne	6,0	6,0	
		$\Delta I$	41,44	35,03	
		<i>q</i>	12,32	8,065	
Souris transgénique 1003	cellules de Clara	<i>n</i>	4	NA	significatif
		Intensité moyenne	44		
		Écart à la moyenne	11		
		$\Delta I$	55,81		
		<i>q</i>	14,37		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	5	significatif
		Intensité moyenne		31,1	
		Écart à la moyenne		8,6	
		$\Delta I$		62,74	
		<i>q</i>		13,9	
	Tumeurs	<i>n</i>	17	17	significatif
		Intensité moyenne	60,0	60,0	
		Écart à la moyenne	4,9	4,9	
		$\Delta I$	40,18	33,77	
<i>q</i>		15,84	9,031		

58.8 ± 6.0 (n = 6) et de 60.0 ± 4.9 (n = 17) dans les cellules tumorales (tableau 2). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-2 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 2. Ceci nous a permis de détecter une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003, dans l'ordre respectif, de 29.75 et de 55.81 au niveau des cellules de Clara ainsi que de 41.44 et de 40.18 au niveau des cellules tumorales en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (tableau 2). Une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de 26.23 et de 62.74 au niveau des pneumocytes de type II ainsi qu'une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de 35.03 et de 33.77 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques 1002 et 1003 respectivement est aussi remarquée en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenu au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (tableau 2).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-2 chez les souris transgéniques de la lignée AS-RAR $\beta$ 2 sont exposés à la figure 13. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 3. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 est de 134 ± 12 (n = 6) au niveau des

**Figure 13 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 2.**

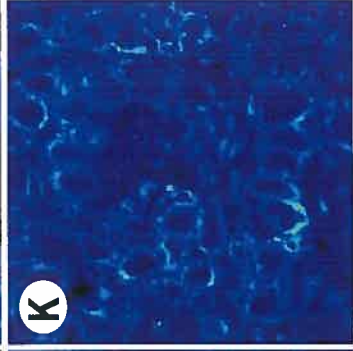
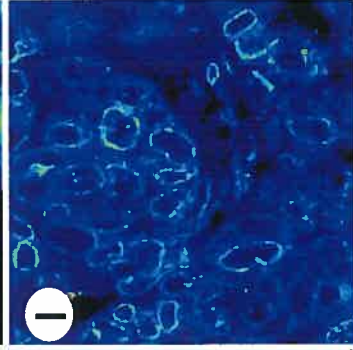
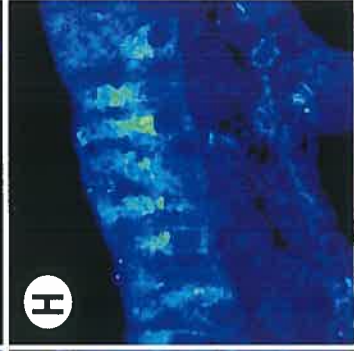
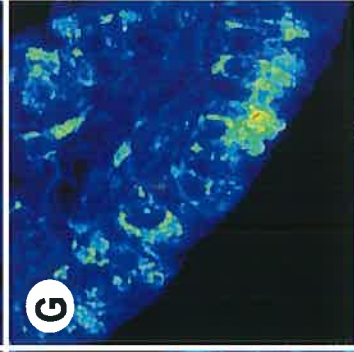
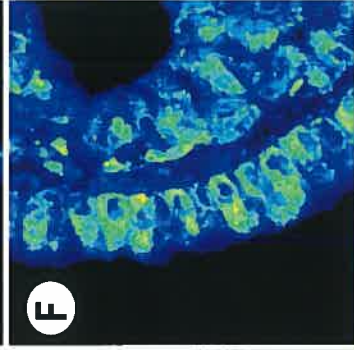
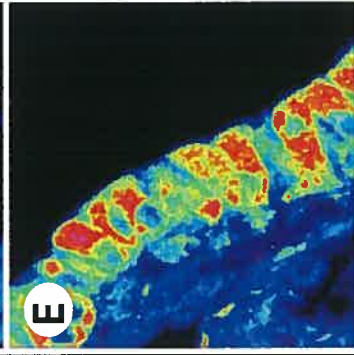
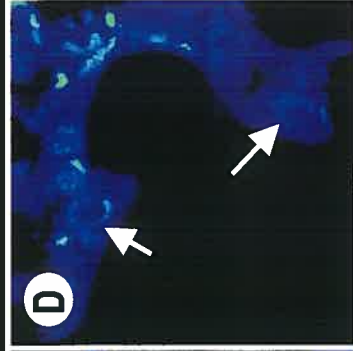
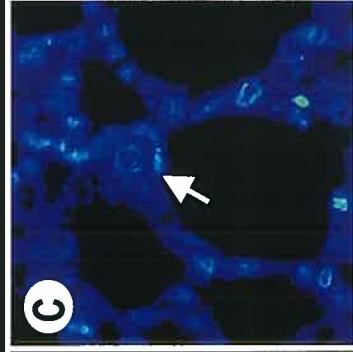
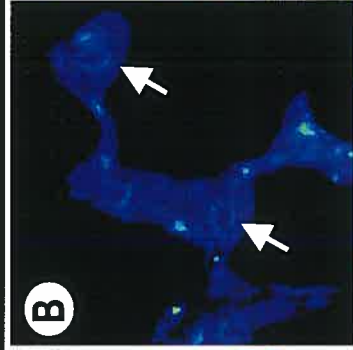
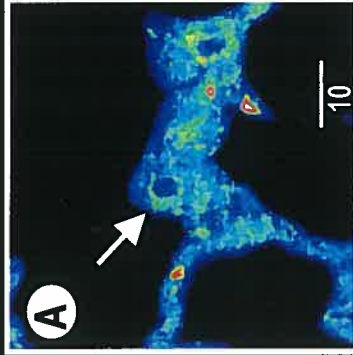
L'anticorps anti-Hoxb-2 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et E) et transgéniques des lignées 422 (B, F et I), 426 (C, G et J), 432 (D, H et K) au niveau des pneumocytes de type II (A, B, C et D), des cellules de Clara (E, F, G et H) et des tumeurs pulmonaires (I, J et K). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

NTG

422

426

432



Pneumocytes  
de type II

Cellules de  
Clara

Tumeurs





**Tableau 3 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 422, 426 et 432 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.724, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

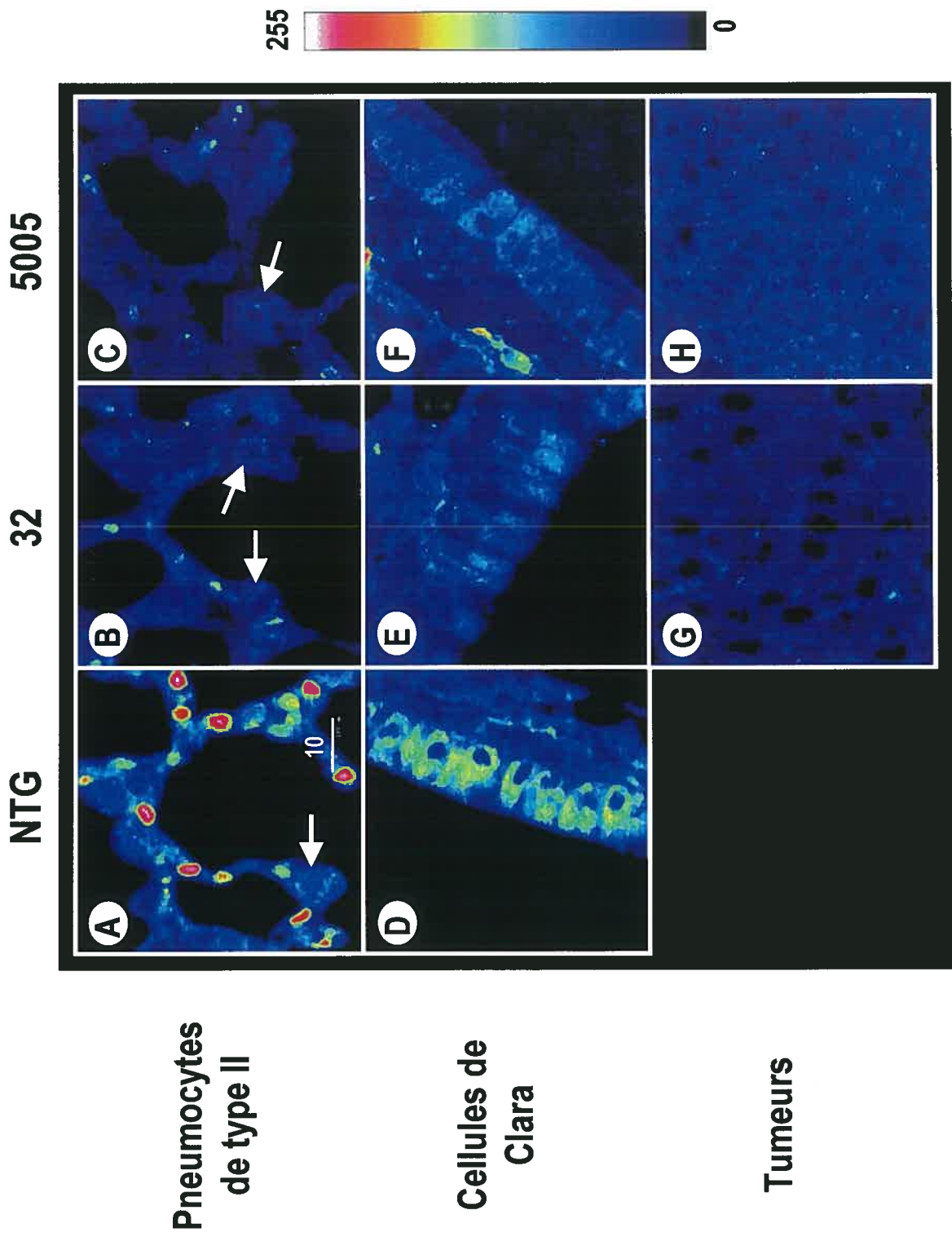
			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	6	NA	NA
		moyenne d'intensité	134		
		Écart à la moyenne	12		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	4	NA
		Intensité moyenne		94	
		Écart à la moyenne		25	
Souris transgénique 422	cellules de Clara	<i>n</i>	4	NA	significatif
		moyenne d'intensité	86,9		
		Écart à la moyenne	7,5		
		$\Delta I$	47,1		
		<i>q</i>	9,037		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	6	significatif
		moyenne d'intensité		32	
		Écart à la moyenne		12	
		$\Delta I$		61,85	
		<i>q</i>		11,87	
	Tumeurs	<i>n</i>	6	6	significatif
		moyenne d'intensité	41,9	41,9	
		Écart à la moyenne	4,3	4,3	
		$\Delta I$	92,08	52,14	
		<i>q</i>	19,75	10,01	
Souris transgénique 426	cellules de Clara	<i>n</i>	13	NA	significatif
		moyenne d'intensité	66		
		Écart à la moyenne	17		
		$\Delta I$	68,08		
		<i>q</i>	17,09		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	5	significatif
		moyenne d'intensité		38,1	
		Écart à la moyenne		9,6	
		$\Delta I$		55,92	
		<i>q</i>		10,32	
	Tumeurs	<i>n</i>	7	7	significatif
		moyenne d'intensité	40,1	40,1	
		Écart à la moyenne	7,4	7,4	
		$\Delta I$	93,9	53,96	
		<i>q</i>	20,9	10,66	
Souris transgénique 432	cellules de Clara	<i>n</i>	7	NA	significatif
		moyenne d'intensité	48		
		Écart à la moyenne	11		
		$\Delta I$	85,49		
		<i>q</i>	19,03		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	7	significatif
		moyenne d'intensité		26,4	
		Écart à la moyenne		2,2	
		$\Delta I$		67,67	
		<i>q</i>		13,37	
	Tumeurs	<i>n</i>	11	11	significatif
		moyenne d'intensité	37,2	37,2	
		Écart à la moyenne	3,3	3,3	
		$\Delta I$	96,81	56,87	
		<i>q</i>	23,63	12,06	

cellules de Clara et de  $94 \pm 25$  ( $n = 4$ ) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 3). Chez les souris transgéniques des lignées 422, 426 et 432, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 est, dans l'ordre respectif, de  $86.9 \pm 7.5$  ( $n = 4$ ), de  $66 \pm 17$  ( $n = 13$ ) et de  $48 \pm 11$  ( $n = 7$ ) dans les cellules de Clara, de  $32 \pm 12$  ( $n = 6$ ), de  $38.1 \pm 9.6$  ( $n = 5$ ) et de  $26.4 \pm 2.2$  ( $n = 7$ ) dans les pneumocytes de type II et finalement de  $41.9 \pm 4.3$  ( $n = 6$ ), de  $40.1 \pm 7.4$  ( $n = 7$ ) et de  $31.2 \pm 3.3$  ( $n = 11$ ) dans les cellules tumorales (tableau 3). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-2 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 3. Ceci nous a permis de détecter une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 chez les souris transgéniques des lignées 422, 426 et 432, dans l'ordre respectif, de 47.1, de 68.08 et de 85.49 au niveau des cellules de Clara ainsi que de 92.08, de 93.9 et de 96.81 au niveau des cellules tumorales en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (tableau 3). Une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de 61.85, de 55.92 et de 67.67 au niveau des pneumocytes de type II ainsi qu'une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de 52.14, de 53.96 et de 56.87 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques 422, 426 et 432 respectivement est aussi remarquée en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenu au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (tableau 3).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-2 chez les souris transgéniques de la lignée RAR $\beta$ 4-like sont exposés à la figure 14. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 4. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 est de  $85 \pm 15$  (n = 21) au niveau des cellules de Clara et de  $39.9 \pm 6.2$  (n = 6) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 4). Chez les souris transgéniques des lignées 32 et 5005, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 est, dans l'ordre respectif, de  $44.4 \pm 4.5$  (n = 16) et de  $49.8 \pm 7.2$  (n = 20) dans les cellules de Clara, de  $31.1 \pm 4.6$  (n = 7) et de  $31.1 \pm 6.3$  (n = 9) dans les pneumocytes de type II et finalement de  $21.6 \pm 5.9$  (n = 25) et de  $39.1 \pm 8.8$  (n = 23) dans les cellules tumorales (tableau 4). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-2 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 4. Ceci nous a permis de détecter une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 chez les souris transgéniques des lignées 32 et 5005, dans l'ordre respectif, de 41.09 et de 35.63 au niveau des cellules de Clara ainsi que de 63.92 et de 46.39 au niveau des cellules tumorales en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (tableau 4). Lorsque la comparaison est faite avec le signal relatif d'immunofluorescence de la

**Figure 14 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques RAR $\beta$ 4-like.**

L'anticorps anti-Hoxb-2 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et D) et transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) au niveau des pneumocytes de type II (A, B, C et D), des cellules de Clara (E, F, G et H) et des tumeurs pulmonaires (I, J et K). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Tableau 4 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 32 et 5005 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-2 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.364, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	21	NA	NA
		Intensité moyenne	85		
		Écart à la moyenne	15		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	6	NA
		Intensité moyenne		39,9	
		Écart à la moyenne		6,2	
Souris transgénique 32	cellules de Clara	<i>n</i>	16	NA	significatif
		Intensité moyenne	44,4		
		Écart à la moyenne	4,5		
		$\Delta I$	41,09		
		<i>q</i>	20,04		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	7	non-significatif
		Intensité moyenne		31,1	
		Écart à la moyenne		4,6	
		$\Delta I$		8,814	
		<i>q</i>		2,565	
	Tumeurs	<i>n</i>	25	25	significatif
		Intensité moyenne	21,5	21,5	
		Écart à la moyenne	5,9	5,9	
		$\Delta I$	63,92	18,39	
		<i>q</i>	34,96	6,547	
Souris transgénique 5005	cellules de Clara	<i>n</i>	20	NA	significatif
		Intensité moyenne	49,8		
		Écart à la moyenne	7,2		
		$\Delta I$	35,63		
		<i>q</i>	18,46		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	9	non-significatif
		Intensité moyenne		31,1	
		Écart à la moyenne		6,3	
		$\Delta I$		8,842	
		<i>q</i>		2,716	
	Tumeurs	<i>n</i>	23	23	significatif / non-significatif
		Intensité moyenne	39,1	39,1	
		Écart à la moyenne	8,8	8,8	
		$\Delta I$	46,39	0,8562	
		<i>q</i>	24,88	0,3023	



protéine Hoxb-2 des pneumocytes chez les souris témoins, une différence significative ( $p < 0.001$ ) de 18.39 est remarquée uniquement avec les cellules tumorales chez les souris de la lignée 32, les autres comparaisons étant non-différenciables significativement (tableau 4).

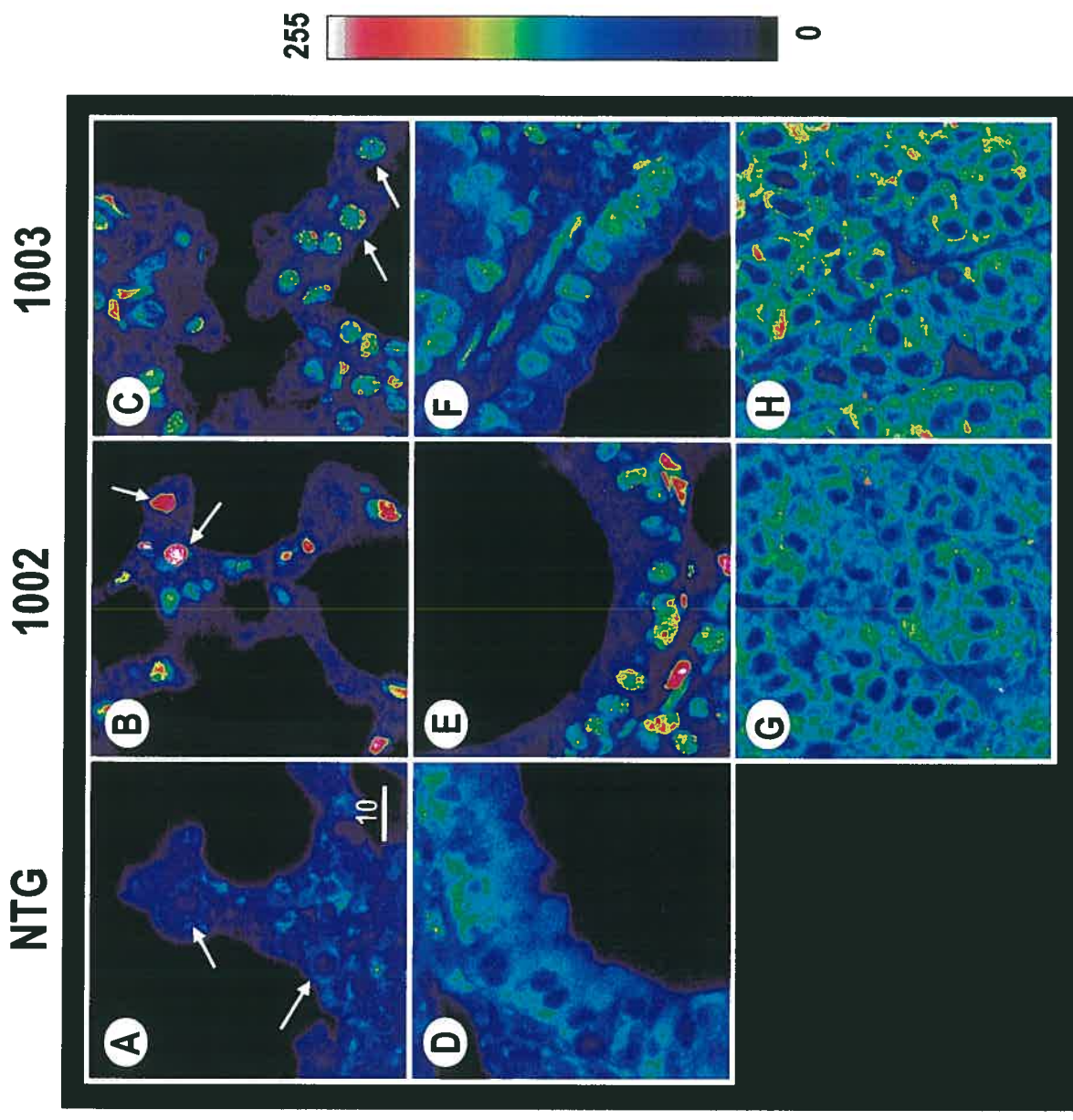
#### **4.2.2 Expression de la protéine Hoxb-3 dans les poumons des souris transgéniques et témoins.**

La détermination de l'expression relative de la protéine Hoxb-3 a été faite dans les poumons des lignées de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like par immunofluorescence et microscopie confocale. La protéine HOXB-3 humaine a une masse moléculaire de 44.3 KDa et elle est exprimée au niveau des poumons chez l'humain adulte (Kappen, 1996, Cillo, 1995). La protéine Hoxb-3 est aussi exprimée au niveau des poumons chez la souris naissante (Bogue *et al.*, 1994; Kappen, 1996). La protéine Hoxb-3 est détectée avec l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin (BabCo, distribué par CanLab, Canada).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-3 chez les souris transgéniques de la lignée AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 sont exposés à la figure 15. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 5. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 est de  $49.2 \pm 7.8$  ( $n = 19$ ) au niveau des cellules de Clara et de  $36.8 \pm 5.0$  ( $n = 22$ ) au niveau des pneumocytes de type II

**Figure 15 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3.**

L'anticorps anti-Hoxb-3 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et D) et transgéniques des lignées 1002 (B, E et G) et 1003 (C, F et H) au niveau des pneumocytes de type II (A, B et C), des cellules de Clara (D, E et F) et des tumeurs pulmonaires (G et H). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Pneumocytes de types II**

**Cellules de Clara**

**Tumeurs**

**Tableau 5 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 1002 et 1003 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.380, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence	
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	19	NA	NA	
		Intensité moyenne	49,2			
		Écart à la moyenne	7,8			
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>		22	NA	
		Intensité moyenne	NA	36,8		
		Écart à la moyenne		5,0		
Souris transgénique 1002	cellules de Clara	<i>n</i>	16	NA	significatif	
		Intensité moyenne	71			
		Écart à la moyenne	10			
		$\Delta I$	-21,78			
		<i>q</i>	9,531			
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>		17	NA	significatif
		Intensité moyenne		63		
		Écart à la moyenne		13		
		$\Delta I$		-26,21		
		<i>q</i>		12,05		
	Tumeurs	<i>n</i>	6	6	NA	significatif
		Intensité moyenne	73,0	73,0		
		Écart à la moyenne	6,8	6,8		
		$\Delta I$	-23,82	-36,2		
		<i>q</i>	7,551	11,67		
Souris transgénique 1003	cellules de Clara	<i>n</i>	12	NA	significatif	
		Intensité moyenne	73			
		Écart à la moyenne	11			
		$\Delta I$	-23,86			
		<i>q</i>	9,606			
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>		17	NA	significatif
		Intensité moyenne		69		
		Écart à la moyenne		10		
		$\Delta I$		-31,73		
		<i>q</i>		14,59		
	Tumeurs	<i>n</i>	6	6	NA	significatif
		Intensité moyenne	74	74		
		Écart à la moyenne	10	10		
		$\Delta I$	-24,96	-37,34		
		<i>q</i>	7,914	12,04		

(tableau 5). Chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 est, dans l'ordre respectif, de  $71 \pm 10$  ( $n = 16$ ) et de  $73 \pm 11$  ( $n = 12$ ) dans les cellules de Clara, de  $63 \pm 13$  ( $n = 17$ ) et de  $69 \pm 10$  ( $n = 17$ ) dans les pneumocytes de type II et finalement de  $73.0 \pm 6.8$  ( $n = 6$ ) et de  $74 \pm 10$  ( $n = 6$ ) dans les cellules tumorales (tableau 5). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-3 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 5. Ceci nous a permis de détecter une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003, dans l'ordre respectif, de 21.78 et de 23.86 au niveau des cellules de Clara ainsi que de 23.82 et de 24.96 au niveau des cellules tumorales en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (tableau 5). Une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) de 26.21 et de 31.73 au niveau des pneumocytes de type II ainsi qu'une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) de 36.2 et de 37.34 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques 1002 et 1003 respectivement est aussi remarquée en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenu au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (tableau 5).

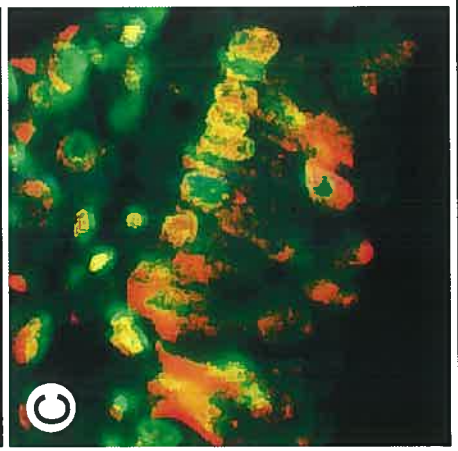
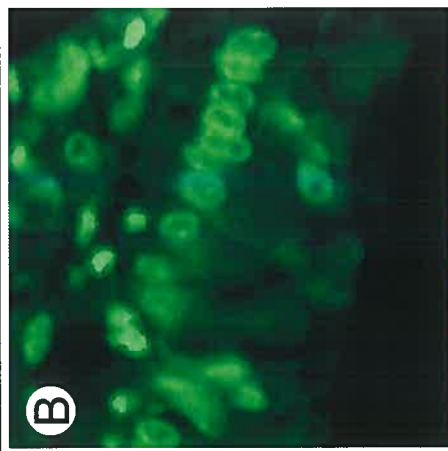
Chez les souris transgéniques 1002 et 1003, le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 semble se concentrer en une seule région au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara, suggérant qu'il y a probablement une relocalisation

du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau nucléaire chez ces cellules. Nous avons utilisé la sonde Bobo-3 afin de localiser les noyaux dans les cellules étudiées et vérifier s'il y a co-localisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 avec le noyau cellulaire tel que montré dans l'exemple à la figure 16. En connaissant la localisation du noyau cellulaire, nous avons pu mesurer séparément le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 situé au niveau nucléaire et au niveau cytoplasmique chez les cellules de Clara et les pneumocytes de type II et de procéder à la détermination du ratio nucléo-cytoplasmique du signal d'immunofluorescence chez les souris transgéniques et témoins dans chaque cellules étudiées tel que décrit par Leclerc *et al.*, 1998. Les statistiques sur le ratio nucléo-cytoplasmique sont exposées dans le tableau 6. Chez les souris témoins, nous avons observé un ratio moyen nucléo-cytoplasmique de  $-0.085 \pm 0.009$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 55$ ) au niveau des pneumocytes de type II et un ratio nucléo-cytoplasmique moyen de  $-0.233 \pm 0.010$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 46$ ) au niveau des cellules de Clara dans les tissus des souris témoins. La valeur négative du ratio nucléo-cytoplasmique indique que le signal est majoritairement cytoplasmique. Au niveau des tissus pulmonaires provenant des souris transgéniques 1002, nous avons observé un ratio nucléo-cytoplasmique moyen de  $0.611 \pm 0.010$  ( $n = 57$ ) au niveau des pneumocytes de type II et un ratio moyen nucléo-cytoplasmique de  $0.433 \pm 0.012$  ( $n = 47$ ) alors que chez les souris transgéniques 1003, nous avons observé un ratio nucléo-cytoplasmique moyen de  $0.503 \pm 0.011$  ( $n = 62$ ) pour les pneumocytes de type II et un ratio nucléo-cytoplasmique de  $0.339 \pm 0.009$  ( $n = 49$ ) pour les cellules de Clara (tableau 6). La valeur positive du signal nucléo-cytoplasmique indique que le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 chez

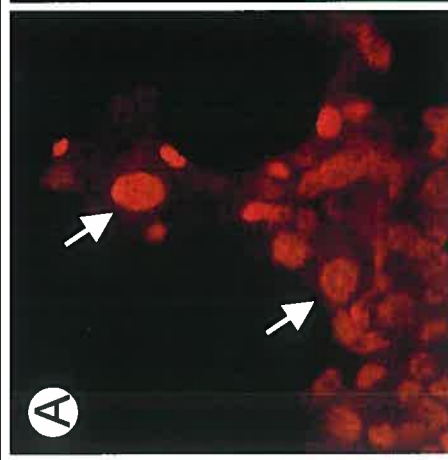
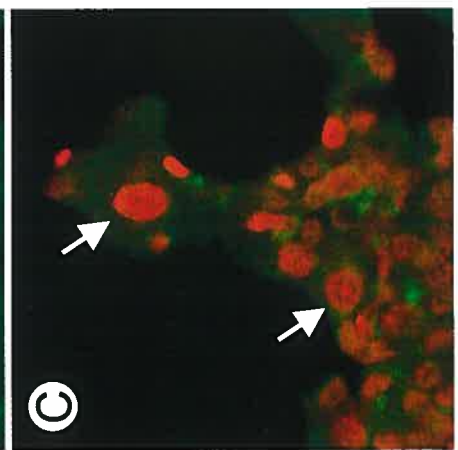
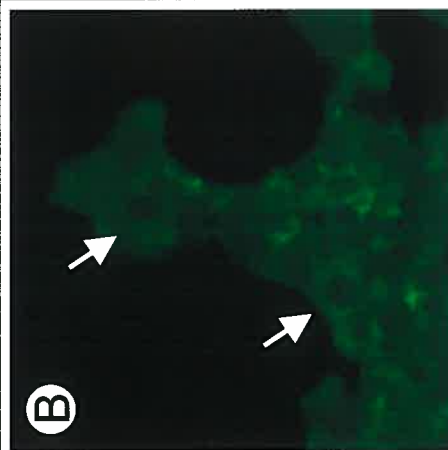
**Figure 16 : Exemples de co-localisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 avec le marqueur nucléaire Bobo3.**

La figure 1 montre un exemple d'une étude faite au niveau des pneumocytes de type II dans le tissu pulmonaire d'une souris témoin où il n'y a pas co-localisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 avec la sonde Bobo-3. Les pneumocytes de type II sont indiqués par les flèches. La figure 2 montre un exemple d'une étude faite au niveau des cellules de Clara dans le tissu pulmonaire d'une souris transgénique de la lignée 422 où il y a co-localisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 avec la sonde Bobo-3. Les figures 1A et 2A représentent la fluorescence émise par la sonde nucléaire Bobo-3 alors que les figures 1B et 2B représentent la fluorescence émise par l'anticorps anti-Hoxb-3 (FITC). Les figures 1C et 2C représentent la superposition des figures 1A avec 1B et 2A avec 2B. Dans la figure 2C, une coloration jaune indique qu'il y a co-localisation des deux signaux de fluorescence (FITC et Bobo-3).





2



1

**Tableau 6 : Statistique sur la distribution du signal nucléo-cytoplasmique au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.**

Les statistiques sur la moyenne de la distribution du signal nucléo-cytoplasmique au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara dans les souris non-transgéniques, et les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003 sont présentées dans ce tableau.  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés,  $R$  représente le ratio du signal nucléo-cytoplasmique,  $\Delta R$  représente la différence entre le ratio du signal nucléo-cytoplasmique de la souris témoin et celui de la souris transgéniques alors que les valeurs  $t$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Bonferroni. Une valeur  $\Delta R$  positive indique que le signal d'immunofluorescence est principalement nucléaire alors qu'une valeur négative indique que le signal est principalement cytoplasmique. Si la valeur  $t$  est supérieure à 2.425, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. Pour toutes les comparaisons de la distribution des données faites par le test de Bonferroni, la valeur  $P$  est inférieure à 0.001.

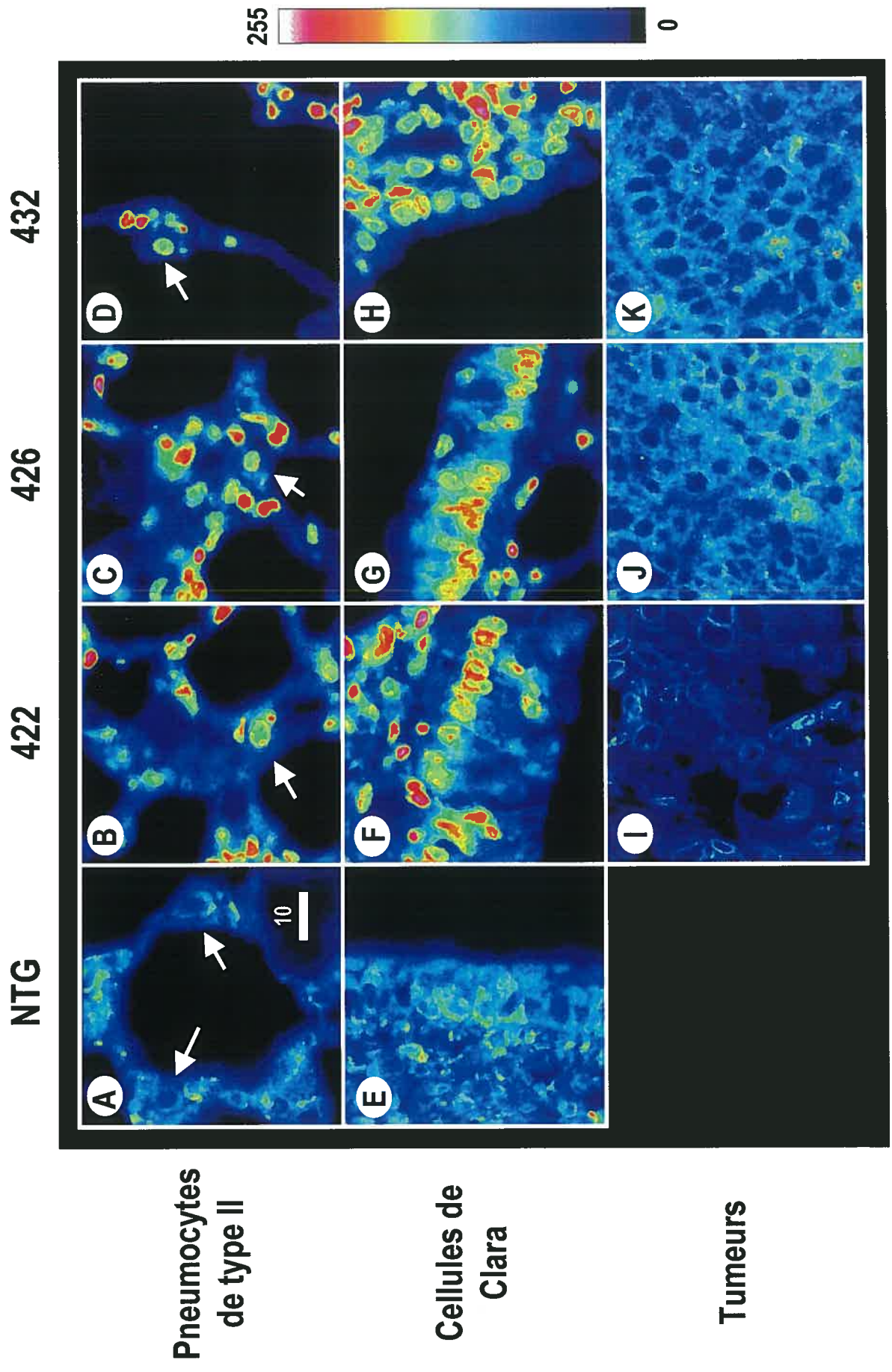
		<b>Pneumocytes de type II</b>	<b>Cellules de Clara</b>
<b>Souris non- transgénique</b>	<i>n</i>	55	46
	<b>Ratio moyen <i>R</i></b>	-0.085	-0.233
	<b>Écart à la moyenne</b>	0.009	0.010
<b>Souris transgénique 1002</b>	<i>n</i>	57	47
	<b>Ratio moyen <i>R</i></b>	0.611	0.433
	<b>Écart à la moyenne</b>	0.010	0.012
	<b><math>\Delta R</math></b>	+0.696	+0.666
	<b><i>t</i></b>	46.8	44.9
<b>Souris transgénique 1003</b>	<i>n</i>	62	49
	<b>Ratio moyen <i>R</i></b>	0.503	0.339
	<b>Écart à la moyenne</b>	0.011	0.009
	<b><math>\Delta R</math></b>	+0.588	+0.572
	<b><i>t</i></b>	40.4	39.0

ces cellules est majoritairement nucléaire. Une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du rapport du signal nucléo-cytoplasmique de 0.696 et de 0.588 au niveau des pneumocytes de type II chez les souris transgéniques 1002 et 1003 respectivement ainsi qu'une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du signal nucléo-cytoplasmique de 0.666 et de 0.572 au niveau des cellules de Clara chez les souris transgéniques 1002 et 1003 respectivement indique qu'il y a une importante relocalisation du signal d'immunofluorescence de Hoxb-3 chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3. Nous devons vérifier s'il y a aussi relocalisation du signal au niveau nucléaire ou au niveau cytoplasmique dans les cellules tumorales chez ces souris transgéniques. Nos résultats suggèrent qu'il y a probablement une relocalisation du signal au niveau cytoplasmique dans ces cellules (figure 15).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-3 chez les souris transgéniques de la lignée AS-RAR $\beta$ 2 sont exposés à la figure 17. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 7. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 est de  $63.7 \pm 4.7$  ( $n = 12$ ) au niveau des cellules de Clara et de  $58.1 \pm 9.4$  ( $n = 7$ ) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 7). Chez les souris transgéniques des lignées 422, 426 et 432, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 est, dans l'ordre respectif, de  $88.2 \pm 9.4$  ( $n = 9$ ), de  $79 \pm 19$  ( $n = 9$ ) et de  $74.2 \pm 8.0$  ( $n = 10$ ) dans les cellules de Clara, de  $86.5 \pm 6.0$  ( $n = 3$ ), de  $77.2 \pm 9.2$  ( $n = 5$ ) et de  $57.7 \pm 8.6$  ( $n = 8$ ) dans les

**Figure 17 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 2.**

L'anticorps anti-Hoxb-3 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et E) et transgéniques des lignées 422 (B, F et I), 426 (C, G et J), 432 (D, H et K) au niveau des pneumocytes de type II (A, B, C et D), des cellules de Clara (E, F, G et H) et des tumeurs pulmonaires (I, J et K). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Pneumocytes de type II**

**Cellules de Clara**

**Tumeurs**

**Tableau 7 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 422, 426 et 432 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.652, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	12	NA	NA
		moyenne d'intensité	63,7		
		Écart à la moyenne	4,7		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	7	NA
		Intensité moyenne		58,1	
		Écart à la moyenne		9,4	
Souris transgénique 422	cellules de Clara	<i>n</i>	9	NA	significatif
		moyenne d'intensité	88,2		
		Écart à la moyenne	9,4		
		$\Delta I$	-24,52		
		<i>q</i>	9,043		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	3	significatif
		moyenne d'intensité		86,5	
		Écart à la moyenne		6,0	
		$\Delta I$		-28,45	
		<i>q</i>		6,705	
	Tumeurs	<i>n</i>	26	26	significatif
		moyenne d'intensité	31,4	31,4	
		Écart à la moyenne	7,9	7,9	
		$\Delta I$	32,28	26,62	
		<i>q</i>	15,04	10,17	
Souris transgénique 426	cellules de Clara	<i>n</i>	9	NA	significatif
		moyenne d'intensité	79		
		Écart à la moyenne	19		
		$\Delta I$	-14,83		
		<i>q</i>	5,469		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	5	significatif
		moyenne d'intensité		77,2	
		Écart à la moyenne		9,2	
		$\Delta I$		-19,15	
		<i>q</i>		5,319	
	Tumeurs	<i>n</i>	19	19	non-significatif
		moyenne d'intensité	64,5	64,5	
		Écart à la moyenne	6,9	6,9	
		$\Delta I$	-0,7533	-6,416	
		<i>q</i>	0,3323	2,36	
Souris transgénique 432	cellules de Clara	<i>n</i>	10	NA	non-significatif
		moyenne d'intensité	74,2		
		Écart à la moyenne	8,0		
		$\Delta I$	-10,44		
		<i>q</i>	3,965		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	8	non-significatif
		moyenne d'intensité		57,7	
		Écart à la moyenne		8,6	
		$\Delta I$		0,3262	
		<i>q</i>		0,1025	
	Tumeurs	<i>n</i>	16	16	non-significatif
		moyenne d'intensité	57,0	57,0	
		Écart à la moyenne	2,9	2,9	
		$\Delta I$	6,678	1,016	
		<i>q</i>	2,844	0,3645	



pneumocytes de type II et finalement de  $31.4 \pm 7.9$  ( $n = 26$ ), de  $64.5 \pm 6.9$  ( $n = 19$ ) et de  $57.0 \pm 2.9$  ( $n = 16$ ) dans les cellules tumorales (tableau 7). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-3 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 7. Ceci nous a permis de détecter une augmentation significative ( $p < 0.01$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 chez les souris transgéniques des lignées 422 et 426, dans l'ordre respectif, de 24.52 et de 14.83 au niveau des cellules de Clara en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (tableau 7). Une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de 28.45 et de 19.15 au niveau des pneumocytes de type II chez les souris transgéniques 422 et 426 respectivement est aussi remarquée en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenu au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (tableau 7). Aucune différence significative du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 dans les cellules de Clara et les pneumocytes de type II chez les souris transgéniques de la lignée 432 avec les cellules correspondantes chez les souris témoins n'est remarquée (tableau 7). Au niveau des cellules tumorales, une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 de 32.28, contre celui retrouvé au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins, et de 26.62, contre celui retrouvé au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins, est remarquée uniquement chez les souris de la lignée transgénique 422 (tableau 7).

Chez les souris transgéniques 422, 426 et 432 le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 semble également se concentrer en une seule région au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara, suggérant qu'il y a probablement une relocalisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau nucléaire chez ces cellules. En utilisant les mêmes démarches utilisées avec Hoxb-3 chez les souris transgéniques 1002 et 1003 avec la sonde Bobo-3 expliqué précédemment, nous avons déterminé le ratio nucléo-cytoplasmique du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara et les pneumocytes de type II chez les souris transgéniques 422, 426 et 432 et témoins. Les statistiques sur le ratio nucléo-cytoplasmique sont exposées dans le tableau 8. Chez les souris témoins, nous avons observé un ratio nucléo-cytoplasmique moyen de  $-0.117 \pm 0.007$  ( $n = 55$ ) au niveau des pneumocytes de type II et un ratio nucléo-cytoplasmique moyen de  $-0.187 \pm 0.008$  ( $n = 53$ ) au niveau des cellules de Clara (tableau 8). La valeur négative du ratio nucléo-cytoplasmique indique que le signal d'immunofluorescence est majoritairement cytoplasmique. Chez les souris transgéniques, nous avons observé au niveau des pneumocytes de type II un ratio nucléo-cytoplasmique de  $0.276 \pm 0.009$  ( $n = 63$ ), de  $0.352 \pm 0.011$  ( $n = 60$ ) et de  $0.342 \pm 0.011$  ( $n = 66$ ) alors qu'au niveau des cellules de Clara, nous avons observé un ratio nucléocytoplasmique de  $0.256 \pm 0.012$  ( $n = 44$ ), de  $0.285 \pm 0.008$  ( $n = 64$ ) et de  $0.244 \pm 0.010$  ( $n = 48$ ) chez les souris des lignées 422, 426 et 432 respectivement (tableau 8). La valeur positive du signal nucléo-cytoplasmique indique que le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 chez ces cellules est majoritairement nucléaire. Une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du rapport du signal nucléo-cytoplasmique de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type

**Tableau 8 : Statistique sur la distribution du signal nucléo-cytoplasmique au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris contrôles.**

Les statistiques sur la moyenne de la distribution du signal nucléo-cytoplasmique au niveau des pneumocytes de type II et des cellules de Clara dans les souris non-transgéniques, et les souris transgéniques des lignées 422, 426 et 432 sont présentées dans ce tableau.  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés,  $R$  représente le ratio du signal nucléo-cytoplasmique,  $\Delta R$  représente la différence entre le ratio du signal nucléo-cytoplasmique de la souris non-transgéniques et celui de la souris transgéniques, alors que les valeurs  $t$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Bonferroni. Si la valeur  $t$  est supérieure à 2.425, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. Une valeur  $\Delta R$  positive indique que le signal d'immunofluorescence est principalement nucléaire alors qu'une valeur négative indique que le signal est principalement cytoplasmique. Pour toutes les comparaisons de la distribution des données faites par le test de Bonferroni, la valeur  $P$  est inférieure à 0.001.

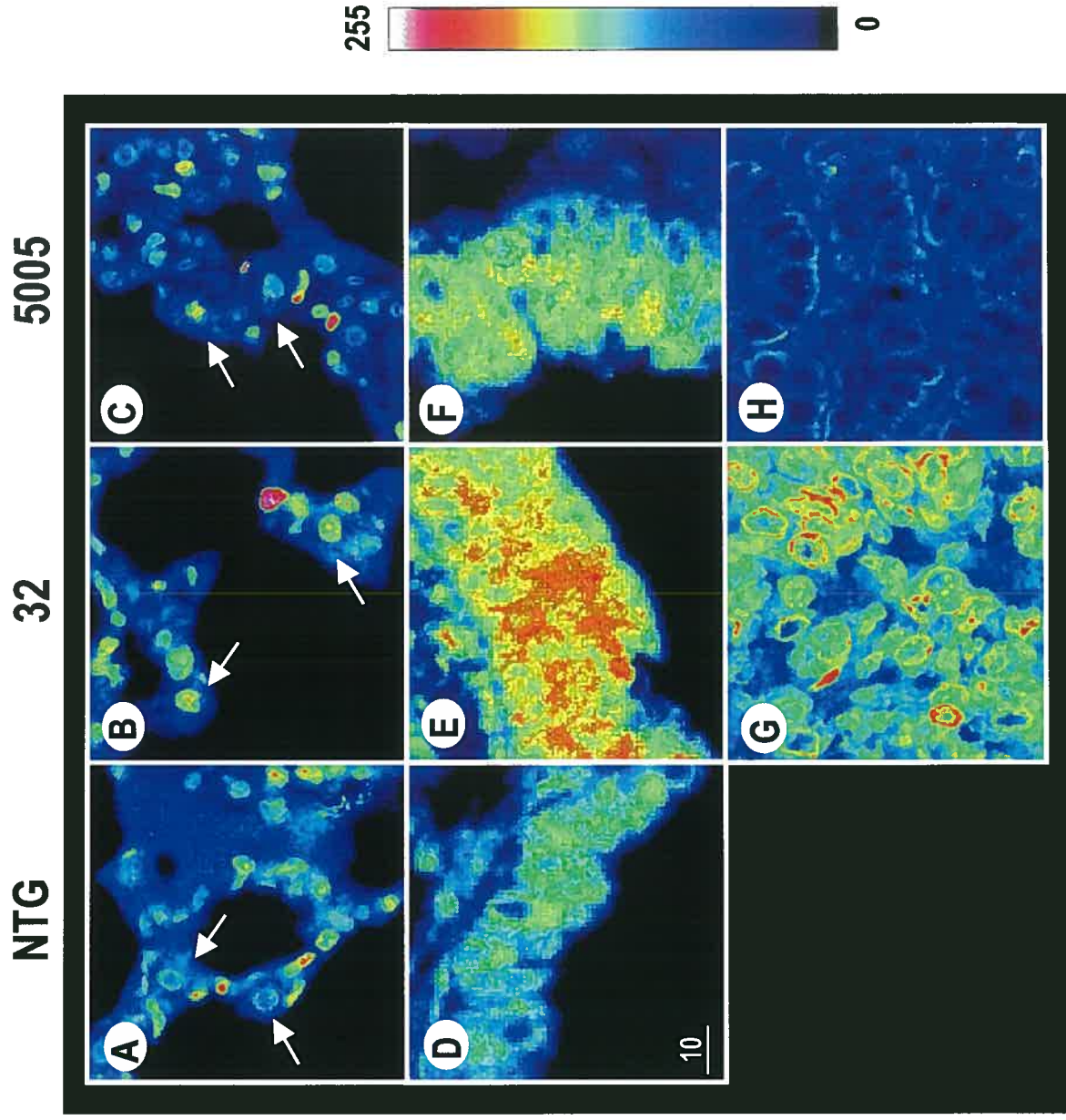
		<b>Pneumocytes de type II</b>	<b>Cellules de Clara</b>
<b>Souris non- transgénique</b>	<i>n</i>	55	53
	ratio moyen <i>R</i>	-0.117	-0.187
	Écart à la moyenne	0.007	0.008
<b>Souris transgénique 422</b>	<i>n</i>	63	44
	ratio moyen <i>R</i>	0.276	0.256
	Écart à la moyenne	0.009	0.012
	$\Delta R$	+0.393	+0.443
	<i>t</i>	27.7	32.8
<b>Souris transgénique 426</b>	<i>n</i>	60	64
	ratio moyen <i>R</i>	0.352	0.285
	Écart à la moyenne	0.011	0.008
	$\Delta R$	+0.468	+0.472
	<i>t</i>	32.7	38.4
<b>Souris transgénique 432</b>	<i>n</i>	66	48
	ratio moyen <i>R</i>	0.342	0.244
	Écart à la moyenne	0.011	0.010
	$\Delta R$	+0.458	+0.431
	<i>t</i>	32.7	32.7

II de 0.393, de 0.468 et de 0.458 ainsi qu'au niveau des cellules de Clara de 0.443, de 0.472 et de 0.431 chez les souris 422, 426 et 432 respectivement indique qu'il y a une importante relocalisation du signal d'immunofluorescence de Hoxb-3 chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 (tableau 8). Nous devons aussi vérifier où se situe principalement le signal d'immunofluorescence dans les cellules tumorales chez ces souris. Nos résultats nous suggèrent qu'il est probablement situé majoritairement au niveau cytoplasmique (figure 17).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-3 chez les souris transgéniques de la lignée RAR $\beta$ 4-like sont exposés à la figure 18. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises avec le microscope confocale et compilée dans le tableau 9. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 est de  $76.7 \pm 6.1$  ( $n = 18$ ) au niveau des cellules de Clara et de  $62.3 \pm 2.6$  ( $n = 4$ ) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 9). Chez les souris transgéniques des lignées 32 et 5005, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 est, dans l'ordre respectif, de  $89 \pm 12$  ( $n = 13$ ) et de  $59.0 \pm 3.8$  ( $n = 17$ ) pour les cellules de Clara, de  $66.57 \pm 0.81$  ( $n = 2$ ) et de  $58 \pm 14$  ( $n = 3$ ) pour les pneumocytes de type II et finalement de  $90.5 \pm 8.0$  ( $n = 15$ ) et de  $54.0 \pm 6.0$  ( $n = 14$ ) pour les cellules tumorales (tableau 9). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-3 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le

**Figure 18 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques RAR $\beta$ 4-like.**

L'anticorps anti-Hoxb-3 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et D) et transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) au niveau des pneumocytes de type II (A, B, C et D), des cellules de Clara (E, F, G et H) et des tumeurs pulmonaires (I, J et K). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Pneumocytes  
de type II**

**Cellules de  
Clara**

**Tumeurs**

**Tableau 9 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 32 et 5005 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.418, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.



		Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence	
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	18	NA	NA
		Intensité moyenne	76,7		
		Écart à la moyenne	6,1		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	4	NA
		Intensité moyenne		65,3	
		Écart à la moyenne		2,5	
Souris transgénique 32	cellules de Clara	<i>n</i>	13	NA	significatif
		Intensité moyenne	89		
		Écart à la moyenne	12		
		$\Delta I$	-12,57		
		<i>q</i>	6,487		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	2	non-significatif
		Intensité moyenne		66,57	
		Écart à la moyenne		0,81	
		$\Delta I$		-1,323	
		<i>q</i>		0,2868	
	Tumeurs	<i>n</i>	15	15	significatif
		Intensité moyenne	90,5	90,5	
		Écart à la moyenne	8,0	8,0	
		$\Delta I$	-13,83	-25,25	
		<i>q</i>	7,427	8,425	
Souris transgénique 5005	cellules de Clara	<i>n</i>	17	NA	significatif
		Intensité moyenne	59,0		
		Écart à la moyenne	3,8		
		$\Delta I$	17,68		
		<i>q</i>	9,819		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	3	non-significatif
		Intensité moyenne		58	
		Écart à la moyenne		14	
		$\Delta I$		7,294	
		<i>q</i>		1,794	
	Tumeurs	<i>n</i>	14	14	significatif / non-significatif
		Intensité moyenne	54,0	54,0	
		Écart à la moyenne	6,0	6,0	
		$\Delta I$	22,69	11,28	
		<i>q</i>	11,96	3,735	

tableau 9. Ceci nous a permis, en comparant avec le signal d'immunofluorescence obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins, de détecter une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 de 12.57 au niveau des cellules de Clara et de 13.83 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques de la lignée 32 ainsi qu'une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal d'immunofluorescence de 17.68 au niveau des cellules de Clara et de 22.69 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques de la lignée 5005 (tableau 9). Nous avons aussi détecté une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 de 25.25 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques de la lignée 32 comparé au signal d'immunofluorescence retrouvé au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins. Aucune différence significative du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 n'est remarquée entre les pneumocytes de type II chez les souris témoins et les pneumocytes de type II chez les souris transgéniques 32 et 5005 ainsi que les cellules tumorales chez les souris 5005 (tableau 9).

#### **4.2.3 Expression de la protéine Hoxb-4 dans les poumons des souris transgéniques et témoins.**

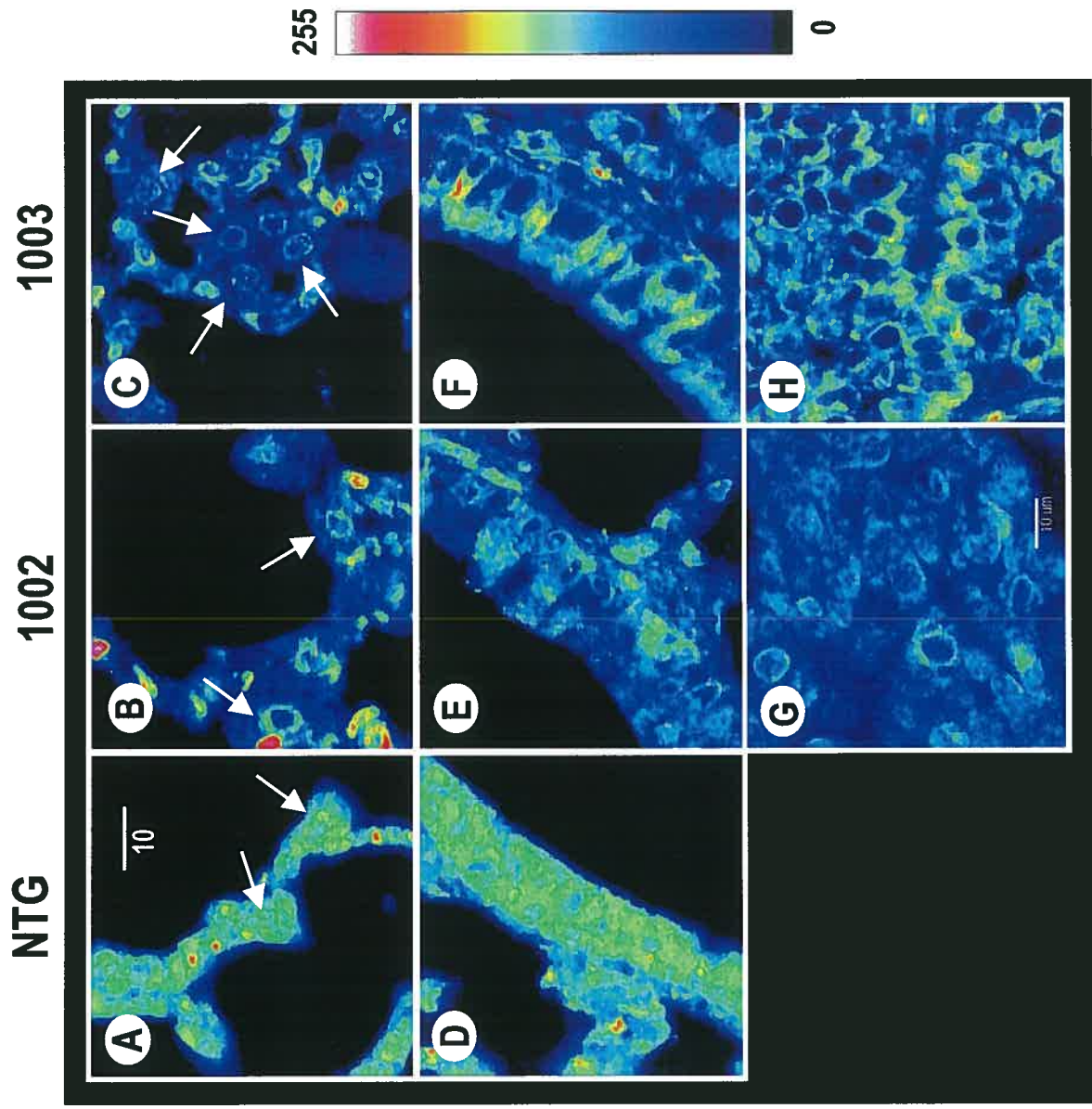
La détermination de l'expression relative de la protéine de Hoxb-4 a été faite dans les poumons des lignées de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like par immunofluorescence et microscopie confocale. La protéine Hoxb-4 murine a une masse moléculaire de 27.5 KDa et est exprimée chez la souris naissante et adulte (Bogue *et al.*, 1994; Kappen, 1996). Chez l'humain adulte, la protéine HOXB-4

est exprimé au niveau des poumons (Kappen, 1995; Cillo, 1995). La protéine de Hoxb-4 est détectée avec l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin (BabCo, distribué par CanLab, Canada).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-4 chez les souris transgéniques de la lignée AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 sont exposés à la figure 19. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 10. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 est de  $93.6 \pm 4.6$  (n = 11) au niveau des cellules de Clara et de  $87.5 \pm 4.6$  (n = 5) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 10). Chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 est, dans l'ordre respectif, de  $58.3 \pm 6.3$  (n = 8) et de  $68 \pm 11$  (n = 10) dans les cellules de Clara, de  $53.7 \pm 1.3$  (n = 4) et de  $44.3 \pm 3.6$  (n = 5) dans les pneumocytes de type II et finalement de  $42.0 \pm 5.7$  (n = 13) et de  $64 \pm 12$  (n = 12) dans les cellules tumorales (tableau 10). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-4 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 10. Ceci nous a permis de détecter une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003, dans l'ordre respectif, de 35.29 et de 25.93 au niveau des cellules de Clara ainsi que de 51.59 et de 30 au niveau des cellules tumorales

**Figure 19 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3.**

L'anticorps anti-Hoxb-4 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et D) et transgéniques des lignées 1002 (B, E et G) et 1003 (C, F et H) au niveau des pneumocytes de type II (A, B et C), des cellules de Clara (D, E et F) et des tumeurs pulmonaires (G et H). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Pneumocytes  
de type II**

**Cellules de  
Clara**

**Tumeurs**

**Tableau 10 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 1002 et 1003 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.445, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

		Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence	
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	11	NA	NA
		Intensité moyenne	93,6		
		Écart à la moyenne	4,6		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	5	NA
		Intensité moyenne		87,5	
		Écart à la moyenne		4,6	
Souris transgénique 1002	cellules de Clara	<i>n</i>	8	NA	significatif
		Intensité moyenne	58,3		
		Écart à la moyenne	6,3		
		$\Delta I$	35,29		
		<i>q</i>	13,58		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	4	significatif
		Intensité moyenne		53,7	
		Écart à la moyenne		1,3	
		$DI$		33,77	
		<i>q</i>		9,001	
	Tumeurs	<i>n</i>	13	13	significatif
		Intensité moyenne	42,0	42,0	
		Écart à la moyenne	5,7	5,7	
		$\Delta I$	51,59	45,47	
		<i>q</i>	22,51	15,45	
Souris transgénique 1003	cellules de Clara	<i>n</i>	10	NA	significatif
		Intensité moyenne	68		
		Écart à la moyenne	11		
		$\Delta I$	25,93		
		<i>q</i>	10,61		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	5	significatif
		Intensité moyenne		44,3	
		Écart à la moyenne		3,6	
		$\Delta I$		43,2	
		<i>q</i>		12,21	
	Tumeurs	<i>n</i>	12	12	significatif
		Intensité moyenne	64	64	
		Écart à la moyenne	12	12	
		$\Delta I$	30	23,88	
		<i>q</i>	12,85	8,022	

en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (tableau 10). Une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de 33.77 et de 43.2 au niveau des pneumocytes de type II ainsi qu'une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de 45.47 et de 23.88 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques 1002 et 1003 respectivement est aussi remarquée en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenu au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (tableau 10).

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-4 chez les souris transgéniques de la lignée AS-RAR $\beta$ 2 sont exposés à la figure 20. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises par le microscope confocale et compilée dans le tableau 11. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 est de  $107 \pm 17$  ( $n = 17$ ) au niveau des cellules de Clara et de  $84.2 \pm 6.1$  ( $n = 6$ ) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 11). Chez les souris transgéniques des lignées 422, 426 et 432, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 est, dans l'ordre respectif, de  $96 \pm 11$  ( $n = 15$ ), de  $107.0 \pm 7.7$  ( $n = 17$ ) et de  $108.0 \pm 9.2$  ( $n = 23$ ) dans les cellules de Clara, de  $73 \pm 16$  ( $n = 7$ ), de  $88 \pm 14$  ( $n = 9$ ) et de  $85 \pm 10$  ( $n = 9$ ) dans les pneumocytes de type II et finalement de  $117 \pm 26$  ( $n = 16$ ), de  $115 \pm 11$  ( $n = 33$ ) et de  $113 \pm 13$  ( $n = 26$ ) dans les cellules tumorales (tableau 11). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes



**Figure 20 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques AS-RAR $\beta$ 2.**

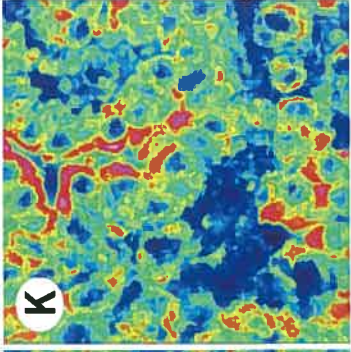
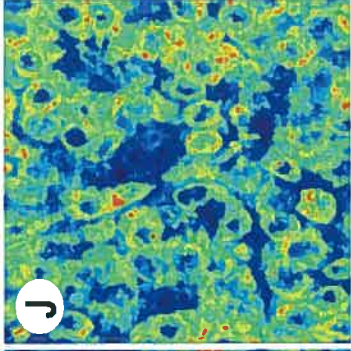
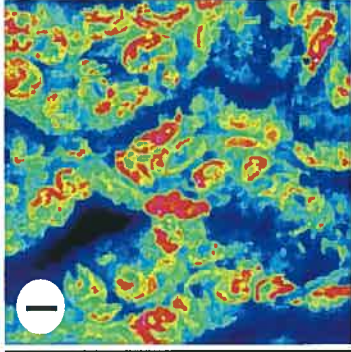
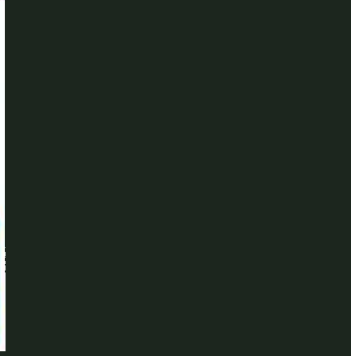
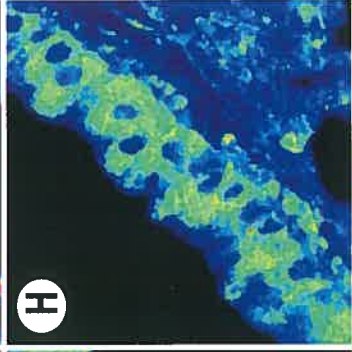
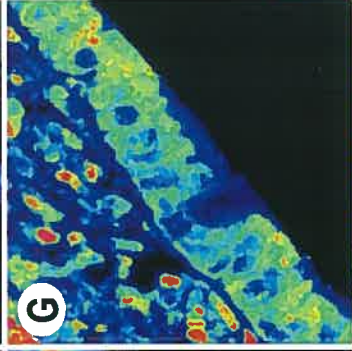
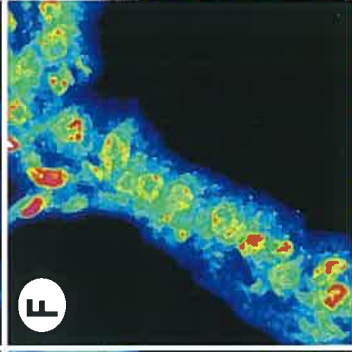
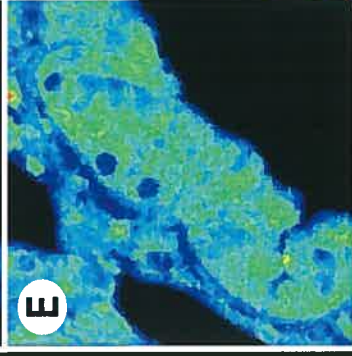
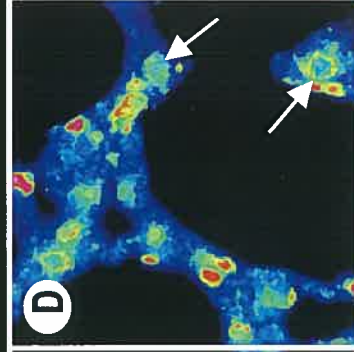
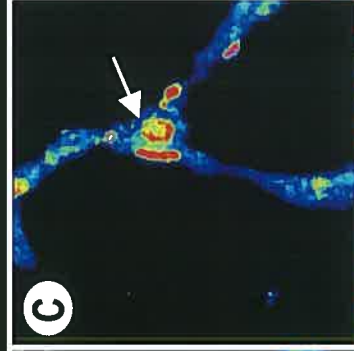
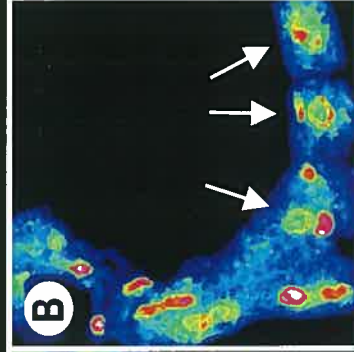
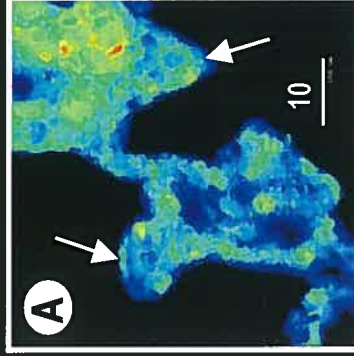
L'anticorps anti-Hoxb-4 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et E) et transgéniques des lignées 422 (B, F et I), 426 (C, G et J), 432 (D, H et K) au niveau des pneumocytes de type II (A, B, C et D), des cellules de Clara (E, F, G et H) et des tumeurs pulmonaires (I, J et K). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

NTG

422

426

432



Pneumocytes  
de type II

Cellules de  
Clara

Tumeurs



**Tableau 11 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 422, 426 et 432 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.630, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.

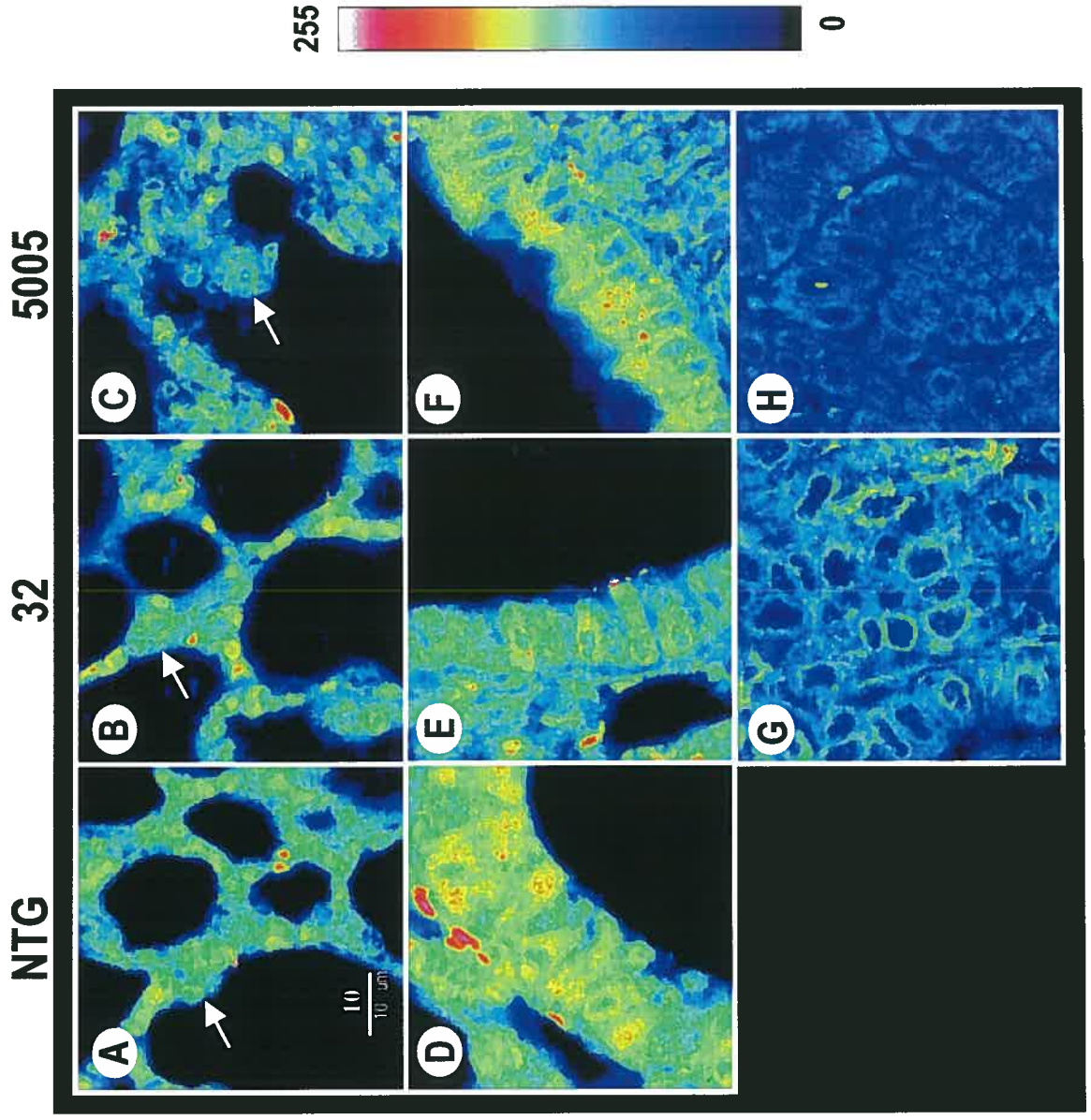
			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	17	NA	NA
		moyenne d'intensité	107		
		Écart à la moyenne	17		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	6	NA
		Intensité moyenne		84,2	
		Écart à la moyenne		6,1	
Souris transgénique 422	cellules de Clara	<i>n</i>	15	NA	non-significatif
		moyenne d'intensité	96		
		Écart à la moyenne	11		
		$\Delta I$	10,89		
		<i>q</i>	3,201		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	7	non-significatif
		moyenne d'intensité		73	
		Écart à la moyenne		16	
		$\Delta I$		11,31	
		<i>q</i>		2,116	
	Tumeurs	<i>n</i>	16	16	non-significatif / significatif
		moyenne d'intensité	117	117	
		Écart à la moyenne	26	26	
		$\Delta I$	-9,843	-32,67	
		<i>q</i>	2,941	7,104	
Souris transgénique 426	cellules de Clara	<i>n</i>	17	NA	non-significatif
		moyenne d'intensité	107,0		
		Écart à la moyenne	7,7		
		$\Delta I$	0,07178		
		<i>q</i>	0,02178		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	9	non-significatif
		moyenne d'intensité		88	
		Écart à la moyenne		14	
		$\Delta I$		-3,388	
		<i>q</i>		0,669	
	Tumeurs	<i>n</i>	33	33	non-significatif / significatif
		moyenne d'intensité	115	115	
		Écart à la moyenne	11	11	
		$\Delta I$	-8,046	-30,88	
		<i>q</i>	2,805	7,241	
Souris transgénique 432	cellules de Clara	<i>n</i>	23	NA	non-significatif
		moyenne d'intensité	108,0		
		Écart à la moyenne	9,2		
		$\Delta I$	-0,9096		
		<i>q</i>	0,296		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	9	non-significatif
		moyenne d'intensité		85	
		Écart à la moyenne		10	
		$\Delta I$		-0,75	
		<i>q</i>		0,1481	
	Tumeurs	<i>n</i>	26	26	non-significatif / significatif
		moyenne d'intensité	113	113	
		Écart à la moyenne	13	13	
		$\Delta I$	-5,459	-28,29	
		<i>q</i>	1,822	6,501	

d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-4 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 11. Ceci nous a permis de détecter une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 chez les souris transgéniques des lignées 422, 426 et 432, dans l'ordre respectif, de 32.67, de 30.88 et de 28.29 au niveau des cellules tumorales en comparant avec le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenu au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (tableau 11). Aucune différence significative n'est perceptible entre le signal relatif d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 retrouvé au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins et celui retrouvé au niveau des cellules de Clara ou des cellules tumorales chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2. Finalement, la comparaison entre les pneumocytes de type II retrouvé chez les souris témoins et ceux retrouvés chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 ne montre aucune différences significative.

Les résultats obtenus par microscopie confocale afin de vérifier l'expression de la protéine Hoxb-4 chez les souris transgéniques de la lignée RAR $\beta$ 4-like sont exposés à la figure 21. L'intensité moyenne du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales a été mesurée sur les images acquises avec le microscope confocale et compilée dans le tableau 12. Chez les souris témoins, l'intensité relative moyenne de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 est de  $110.9 \pm 9.8$  ( $n = 12$ ) au niveau des cellules de Clara et de  $91 \pm 11$  ( $n = 10$ ) au niveau des pneumocytes de type II (tableau 12). Chez les souris transgéniques des lignées 32 et 5005, l'intensité relative moyenne

**Figure 21 : Signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau pulmonaire chez des souris témoins ou transgéniques RAR $\beta$ 4-like.**

L'anticorps anti-Hoxb-4 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence entre les souris témoins (A et D) et transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) au niveau des pneumocytes de type II (A, B, C et D), des cellules de Clara (E, F, G et H) et des tumeurs pulmonaires (I, J et K). L'échelle de pseudo-couleur située à droite de la figure indique l'intensité du signal de fluorescence de Hoxb-2. Cette échelle va de 0 à 255. L'échelle de taille dans le panneau A correspond à 10  $\mu$ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.



**Pneumocytes  
de type II**

**Cellules de  
Clara**

**Tumeurs**

**Tableau 12 : Statistique sur la moyenne de l'intensité du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales dans les poumons de souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like et les souris témoins.**

Chaque valeurs de moyenne d'intensité de fluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenues au niveau des tissus chez les souris transgéniques 32 et 5005 ont été comparées à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins (colonne cellules de Clara) ou encore à la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 obtenue au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins (colonne pneumocytes de type II).  $n$  représente le nombre d'échantillons analysés, intensité moyenne représente la moyenne de l'intensité d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules étudiées,  $\Delta I$  représente la différence entre l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 de la souris témoins et celui de la souris transgénique alors que les valeurs  $q$  ont été obtenues suite à la comparaison de la distributions des données obtenues par le test de Tukey-Kramer. Une valeur  $\Delta I$  positive indique une diminution du signal d'immunofluorescence alors qu'une valeur négative indique une augmentation du signal. Si la valeur  $q$  est supérieure à 4.412, alors la valeur  $P$  sera inférieure à 0.05. La dernière colonne (différence) indique si  $\Delta I$  est significatif ou non. NA indique que la donnée est non applicable.



			Cellules de Clara	Pneumocytes de type II	Différence
Souris témoin	cellules de Clara	<i>n</i>	12	NA	NA
		Intensité moyenne	110,9		
		Écart à la moyenne	9,8		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	10	NA
		Intensité moyenne		91	
		Écart à la moyenne		11	
Souris transgénique 32	cellules de Clara	<i>n</i>	18	NA	non-significatif
		Intensité moyenne	103		
		Écart à la moyenne	12		
		$\Delta I$	7,683		
		<i>q</i>	3,128		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	4	non-significatif
		Intensité moyenne		90	
		Écart à la moyenne		11	
		$\Delta I$		0,8215	
		<i>q</i>		0,2107	
	Tumeurs	<i>n</i>	21	21	significatif
		Intensité moyenne	61,3	61,3	
		Écart à la moyenne	8,9	8,9	
		$\Delta I$	49,59	29,44	
		<i>q</i>	20,79	11,63	
Souris transgénique 5005	cellules de Clara	<i>n</i>	10	NA	non-significatif
		Intensité moyenne	110,0		
		Écart à la moyenne	4,2		
		<i>q</i>	0,3376		
	Pneumocytes de type II	<i>n</i>	NA	4	non-significatif
		Intensité moyenne		85,7	
		Écart à la moyenne		5,8	
		$\Delta I$		5,032	
	Tumeurs	<i>n</i>	11	11	significatif / non-significatif
		Intensité moyenne	98,7	98,7	
		Écart à la moyenne	6,0	6,0	
		<i>q</i>	4,436	2,759	

de l'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 est, dans l'ordre respectif, de  $103 \pm 12$  ( $n = 18$ ) et de  $110.0 \pm 4.2$  ( $n = 10$ ) pour les cellules de Clara, de  $90 \pm 11$  ( $n = 4$ ) et de  $85.7 \pm 5.8$  ( $n = 4$ ) pour les pneumocytes de type II et finalement de  $61.3 \pm 8.9$  ( $n = 21$ ) et de  $98.7 \pm 6.0$  ( $n = 11$ ) pour les cellules tumorales (tableau 12). Des calculs statistiques ont été faits sur ces données en comparant les valeurs d'intensités relatives moyennes d'immunofluorescences de la protéine Hoxb-4 obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez les souris témoins et les résultats sont présentés dans le tableau 12. Ceci nous a permis, en comparant avec le signal relatif moyen d'immunofluorescence obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins, de détecter une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de 49.59 et de 12.2 du signal relatif moyen d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques des lignées 32 et 5005 respectivement. Nous avons aussi détecté une diminution significative ( $p < 0.001$ ) du signal relatif moyen d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 de 29.44 au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques de la lignée 32 en comparant avec le signal retrouvé au niveau des pneumocytes chez les souris témoins. Aucune différence significative visible du signal relatif moyen d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 n'est remarquée entre les cellules de Clara retrouvées chez les souris témoins et les cellules de Clara retrouvées chez les souris transgéniques 32 et 5005 (tableau 12). Finalement, la comparaison du signal relatif moyen d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 au niveau des pneumocytes de type II chez les souris témoins avec le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 retrouvé au niveau des cellules tumorales chez les souris transgéniques 5005 et celui retrouvé au niveau des pneumocytes de type

II chez les souris transgéniques 32 et 5005 ne montre aucune différence significative (tableau 12).

#### **4.3 Analyse de l'homogénéité de pneumocytes de type II purifié à partir des poumons de souris.**

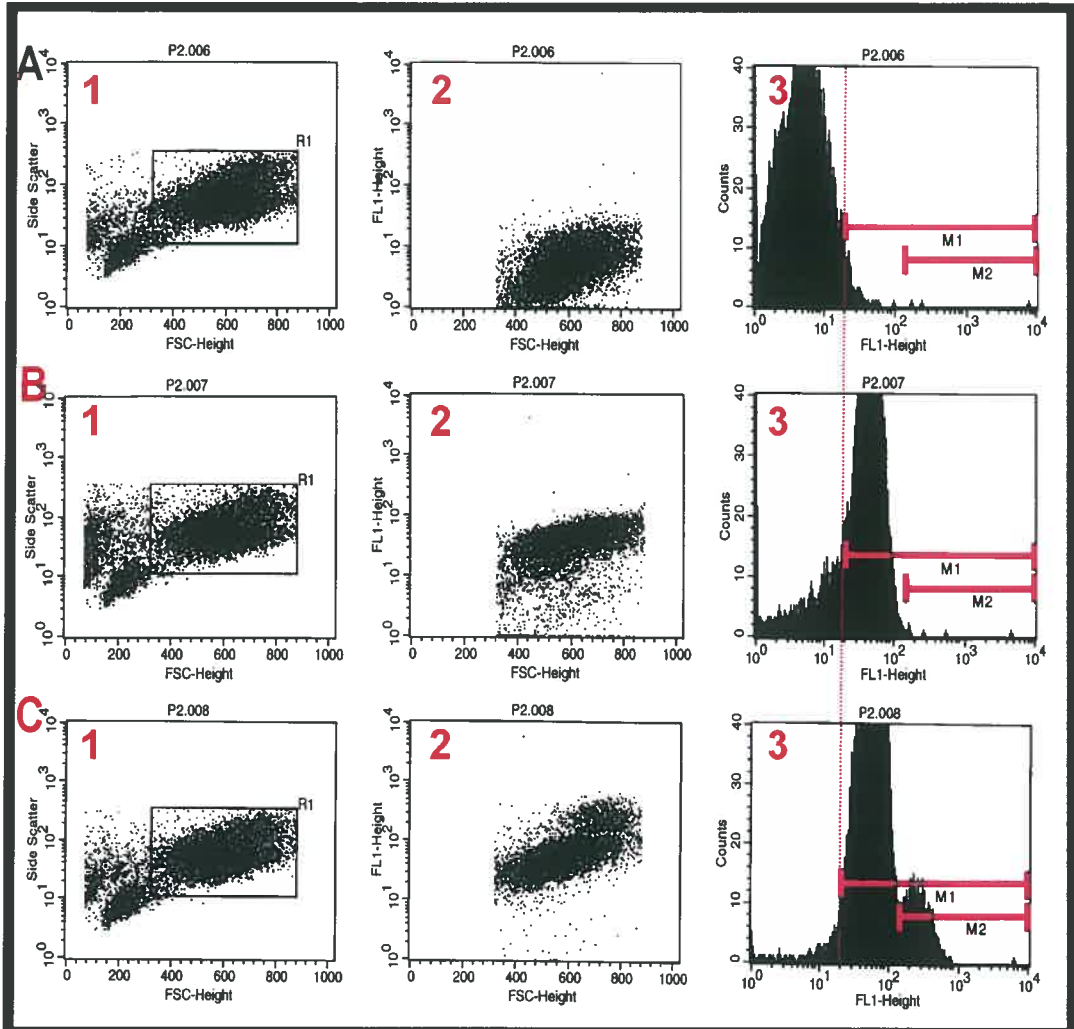
Afin de vérifier l'homogénéité des pneumocytes de type II isolés et purifiés à partir des poumons de souris témoins ou transgéniques, nous avons vérifié la présence de la protéine du surfactant B (SP-B), un marqueur cellulaire spécifique aux cellules de Clara et aux pneumocytes de type II (SP-B) ainsi que le marqueur cellulaire spécifique aux cellules de Clara (CC10). Nous avons évalué la présence de ces marqueurs par cytofluorimétrie dans un échantillon d'une culture primaire de pneumocytes de type II purifiés à partir d'une souris témoin (figure 22A). Selon cette technique, nous avons pu évaluer que les pneumocytes de type II représentent environ 70% ( $82.66\% - 11.53\% = 71.13\%$ ; tableau 13) des cellules purifiées alors que les cellules de Clara, considérées comme étant le contaminant principal de cette technique, représentent environ 12% (11.53%) de l'extrait cellulaire (Figure 22B et tableau 13). Cela laisse 15 à 20 % ( $100\% - 11.53\% - 71.13\% = 17.34\%$ ; tableau 13) de cellules non marquées ou contaminantes.

#### **4.4 Analyse de la distribution des pneumocytes de type II dans le cycle cellulaire.**

En sachant que l'expression des gènes *Hox* est altérée dans les modèles de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like, et que des signes d'hyperplasie évidents apparaissent rapidement vers l'âge de 8 à 12 mois chez ces

**Figure 22 : Analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II extraits et purifiés de poumons d'une souris témoin.**

L'échantillon témoin marqué uniquement avec l'anticorps secondaire nous a permis de déterminer le bruit de fond à partir duquel nous avons fixé la limite de fluorescence minimale (A3). L'échantillon marqué par l'anticorps anti-SP-B détermine la proportion des cellules qui sont soit des cellules de Clara, soit des pneumocytes de type II (B3). L'échantillon marqué par l'anticorps anti-CC10 détermine la proportion des cellules qui sont des cellules de Clara (C3). Les deux pics visibles dans C3 indiquent les cellules marquées non spécifiquement par l'anticorps (premier pic) et les cellules de Clara marquée spécifiquement par l'anticorps (deuxième pic). Le cadre de lecture M1 représente la population totale de cellules dépassant la limite d'intensité de fluorescence minimale définie selon la figure A3 alors que le cadre de lecture M2 représente la population cellulaire marquée spécifiquement par l'anticorps anti-CC10 (figure C3). Les figures A2, B2 et C2 représentent l'intensité de fluorescence de chaque échantillon analysé selon le cadre de lecture R1 délimité en A1, B1 et C1 selon les paramètres « forward scatter » (FSC) et « side scatter » (SSC).



**Tableau 13 : Analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II purifiés des poumons d'une souris témoin.**

Dans le tableau A, nous voyons les résultats obtenus pour l'analyse de l'homogénéité des pneumocytes de type II purifiés de poumons d'une souris témoin. Les cadres de lecture M1 et M2 correspondent aux cadres de lectures définis dans la figure 19. La colonne « évènements comptés » correspond au nombre de cellules comptées dans chaque cadre de lecture alors que la colonne « évènements totaux » correspond au nombre total de cellules comptées lors du test. Les résultats présentés dans la colonne « % cellules selon les cadres de lecture » ont été obtenus en divisant les résultats dans la colonne « évènements comptés » par ceux présentés dans la colonne « évènements totaux » selon la ligne correspondante et en multipliant par 100. Les résultats indiqués dans la ligne « contrôle » correspondent aux résultats obtenus pour le marquage témoin alors que les résultats obtenus pour la ligne « SP-B » et « CC10 » correspondent aux résultats obtenus pour les cellules marquées avec l'anticorps anti-SP-B et l'anticorps anti-CC10 respectivement. Les résultats exposés dans le tableau B représentent la proportion des pneumocytes de type II (pourcentage des cellules marquées par SP-B – pourcentage cellules marquées par CC10), des cellules de Clara et des cellules contaminantes autre que les cellules de Clara (100% - pourcentage pneumocytes de type II – pourcentage cellules de Clara) dans l'extrait purifié des pneumocytes de type II.

<b>A</b>	Cadre de lecture	Événements compté	Événements totaux	% cellules selon les cadres de lectures
Contrôle	M1	148	8223	1,80%
	M2	3	8223	0,04%
SP-B	M1	6369	7705	82,66%
	M2	6	7705	0,08%
CC10	M1	7750	8029	96,53%
	M2	926	8029	11,53%

<b>B</b>	Pneumocytes type II	Cellules Clara	Cellules contaminantes
Pourcentages cellules (%)	71.13	11.53	17.34

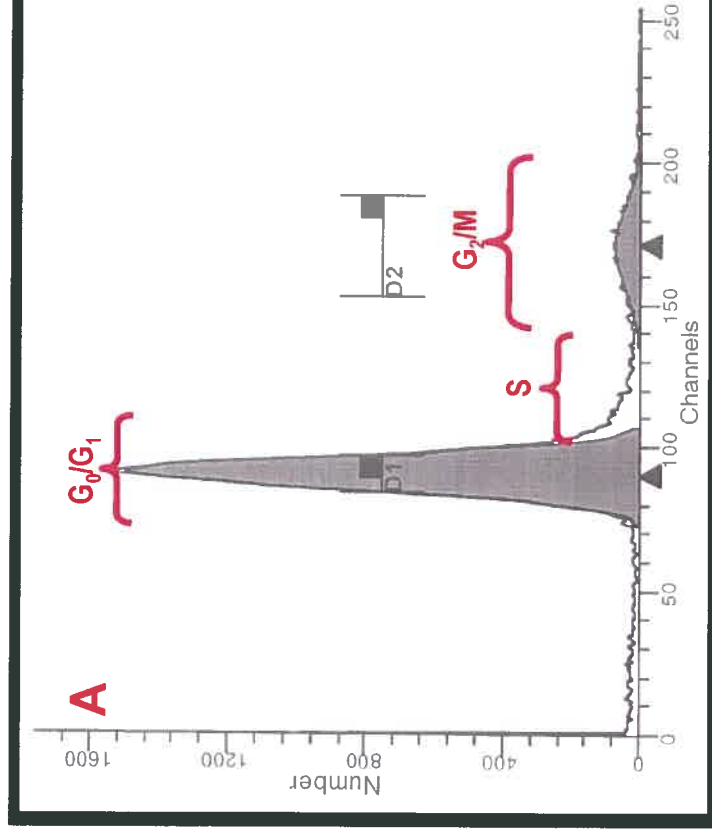
souris, nous avons décidé de vérifier s'il y a déjà une augmentation de la prolifération cellulaire chez de jeunes souris âgées de moins de huit mois. Pour ce faire, nous avons analysé la distribution de pneumocytes de type II au niveau du cycle cellulaire selon leurs contenus en ADN nucléaire (Figure 23). L'analyse a été faite sur des pneumocytes de type II extraits d'une souris transgénique de la lignée 422 âgée de six mois (figure 23-A) ou d'une souris témoin âgée de six mois (figure 23-B). En analysant le contenu en ADN de chaque cellule, nous avons pu déterminer la proportion des cellules en phase  $G_0/G_1$  (représenté par le premier pic), en phase  $G_2/M$  (représenté par le deuxième pic) et en phase S (zone entre les deux pics). Le tableau 14 montre la distribution exprimée en pourcentage des cellules dans le cycle cellulaire. Dans ce tableau, nous pouvons remarquer que chez la jeune souris transgénique, 85% des pneumocytes de type II sont en phase  $G_0/G_1$ , 7% en phase S et 8% en phase  $G_2/M$ . Chez la souris témoin, 83% des pneumocytes de type II sont en phase  $G_0/G_1$ , 11% en phase S et 6% en phase  $G_2/M$ . À noter que ces résultats ont été obtenus au cours d'une seule expérience, et représentent uniquement des résultats préliminaires. Des expériences devront aussi être effectuées avec des souris de plus de 12 mois afin de vérifier si le pourcentage de cellules en prolifération change avec l'âge de la souris.



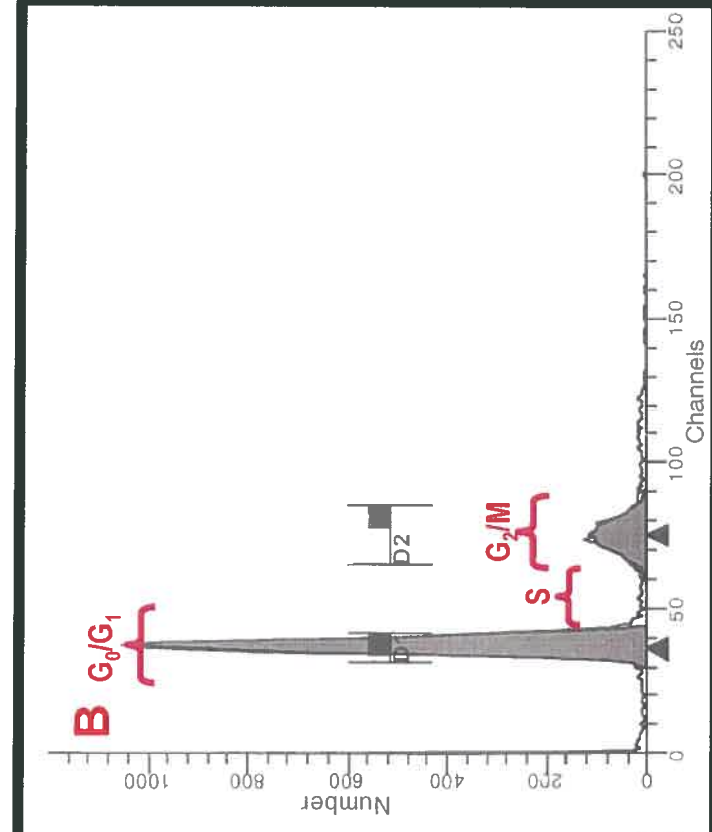
**Figure 23 : Distribution des pneumocytes de type II provenant de souris transgéniques ou témoins dans le cycle cellulaire.**

Voici la distribution des pneumocytes de type II dans le cycle cellulaire chez une souris transgénique de la lignée 422 âgée de 6 mois (A) et chez une souris témoins âgée de 6 mois (B). Dans chacune de ces figures, le premier pic (correspondant au cadre d'analyse D1) représente les cellules en phase  $G_0$  et  $G_1$  du cycle cellulaire ( $2n$  ADN), le deuxième pic (correspondant au cadre d'analyse D2) représente les cellules en phase  $G_2$  et M ( $4n$  ADN) du cycle cellulaire alors que la zone entre ces deux pics représente les cellules en phase S du cycle cellulaire (transition  $2n$  vers  $4n$  ADN).

# Transgénique (422)



# Témoin



	<b>A (transgénique)</b>	<b>B (souris témoin)</b>
<b>Phases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	<b>85,20%</b>	<b>82,74%</b>
<b>Phases S</b>	<b>6,72%</b>	<b>11,08%</b>
<b>Phases G<sub>2</sub>/M</b>	<b>8,09%</b>	<b>6,18%</b>

**Tableau 14 : Analyse de la distribution des pneumocytes de type II provenant de souris transgéniques ou témoins dans le cycle cellulaire.**

Voici la distribution des pneumocytes de type II dans chaque étape du cycle cellulaire (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>/M) chez la souris transgénique de la lignée 422 (colonne A) ou témoin (colonne B). Ces données ont été obtenues suite à l'analyse des graphiques exposés à la figure 23.

## **5. Discussion**

La première hypothèse de mon projet de recherche était de montrer que l'expression des gènes *Hox* est dérégulée lors du processus de tumorigenèse pulmonaire induit suite à une altération de l'expression des différentes isoformes du récepteur à l'acide rétinoïque RAR $\beta$ . Ceci, dans le but de démontrer qu'il existe une étroite corrélation entre la perte d'expression du gène RAR $\beta$  et le dérèglement de l'expression des gènes *Hox*. Par ailleurs, nous voulions déterminer si les gènes *Hox* étaient impliqués dans le processus de la tumorigenèse pulmonaire. Le deuxième but de ce projet de recherche était de mettre au point une technique de purification et de mise en culture de pneumocytes de type II de poumons de souris. Nous pourrions utiliser ces cellules comme modèle cellulaire afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le dérèglement de l'expression des gènes *Hox*.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un dérèglement de l'expression des gènes *Hox* dans la tumorigenèse pulmonaire lorsque l'expression de RAR $\beta$  est réduite ou aberrante, nous avons utilisé différents modèles de souris transgéniques. Parmi ces modèles de souris transgéniques, certaines lignées sous-expriment différentes isoformes de RAR $\beta$  grâce à l'expression de construction antisens dirigés spécifiquement contre ces isoformes (les souris transgéniques portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2). Ces souris reproduisent *in vivo* la perte d'expression de RAR $\beta$  observée chez la plupart des tumeurs pulmonaires humaines. Nous avons aussi utilisé des lignées de souris transgéniques surexprimant l'isoforme RAR $\beta$ 4 (souris transgéniques portant le transgène RAR $\beta$ 4-like) reproduisant *in vivo* la surexpression de l'isoforme naturellement tronquée RAR $\beta$ 4 observée dans les tumeurs pulmonaires de type adénocarcinome chez l'humain (Bérard *et al.*, 1994). Ces différents modèles de

souris transgéniques sont excellents pour étudier et démontrer l'implication possible des gènes *Hox* dans la tumorigénèse pulmonaire lorsque l'expression de RAR $\beta$  est affectée.

Les transgènes antisens (AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et AS-RAR $\beta$ 2) diminuent la présence au niveau protéique des récepteurs nucléaires ciblés (Bérard *et al.*, 1996) sauf chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 qui surexpriment fortement l'isoforme RAR $\beta$ 2 endogène tout en réduisant de moitié l'expression de l'isoforme RAR $\beta$ 4 (Bellehumeur *et al.*, en préparation). Ces changements important de l'expression des autres isoformes de RAR $\beta$  chez les souris AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 pourraient expliquer le retard dans l'apparition des tumeurs pulmonaires par rapport aux autres types de souris transgéniques. Lorsque les souris portent le transgène RAR $\beta$ 4-like, les souris sont aussi fortement susceptibles au développement de tumeurs pulmonaires (voir tableau 1B; souris 32 et 5005). Rappelons que cela est dû au fait que le récepteur RAR $\beta$ 4 pourrait être une isoforme dominante négative (Sommer *et al.*, 1999) et nuirait à la liaison des isoformes RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2, RAR $\beta$ 3 et des autres isoformes RAR (RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$ ) sur leurs éléments de réponse et empêcherait ainsi ceux-ci d'agir de façon adéquate.

Les raisons qui nous ont poussé à étudier l'implication des gènes *Hox* dans le processus de tumorigénèse pulmonaire sont diverses. En premier lieu, nous savons que les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque sont impliqués dans le développement de tumeurs au niveau pulmonaire (Bérard *et al.*, 1996; Bérard *et al.*, 1994). Tel qu'indiqué dans l'introduction, nous savons aussi que les récepteurs à l'acide rétinoïque ont la capacité de contrôler directement ou indirectement l'expression des gènes *Hox*. En effet, certains gènes *Hox* possèdent un élément de réponse à l'acide rétinoïque dans leur promoteur comme par exemple les gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-4*, *Hoxa-9*, *Hoxb-1*, *Hoxb-4* et

*Hoxd-4* (Langston et Gudas, 1992; Langston *et al.*, 1997; Packer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1996; Popperl et Featherstone, 1993; Ogura et Evans, 1995; Gould *et al.*, 1998). De plus, les gènes *Hox*, une fois activés, ont la capacité de s'autostimuler et d'activer d'autres gènes *Hox* sur le même complexe de façon séquentielle en 3' vers 5' (figure 6; Flagiello *et al.*, 1997). Ensuite, les gènes *Hox* sont reconnus pour participer à la régulation de plusieurs aspects de l'homéostasie cellulaire pouvant éventuellement être impliqués dans des processus de tumorigenèse comme le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Bromleigh et Freedman, 2000), l'apoptose (Izon *et al.*, 1998) et l'angiogenèse (Boudreau *et al.*, 1997). Ensuite, dans plusieurs cas de tumeurs humaines, une expression aberrante de plusieurs gènes *Hox* a été remarquée (De Vita *et al.*, 1993; Tiberio *et al.*, 1994; Cillo, 1995; Flagiello *et al.*, 1997; Cillo *et al.*, 1999; Raman *et al.*, 2000; Vider *et al.*, 2000). Certains de ces gènes *Hox* possèdent un caractère oncogénique étant donné qu'ils ont la capacité de transformer des lignées cellulaires suite à leur surexpression (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001; Krosi *et al.*, 1998; Krosi et Sauvageau, 2000; Perkins et Cory, 1993; Aberdam *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1990; Maulbecker et Gruss, 1993).

Les différents modèles de souris transgéniques que nous utilisons sont très particuliers. Entre autres, un phénomène d'évolution dans la tumorigenèse pulmonaire est remarqué au niveau des souris transgéniques tel que montré dans la figure 11. Lorsque les souris sont âgées de moins de six mois, les coupes histologiques des poumons des souris transgéniques sont semblables aux coupes histologiques des poumons provenant de souris témoins et présentent toutes un épithélium alvéolaire constitué d'une fine dentelle de cellules en monocouche. Cependant, chez les souris

transgéniques âgées de plus de 8 mois, des signes évidents d'hyperplasie sont visibles. Ce phénomène n'est cependant pas présent chez les souris témoins. Une forte augmentation de l'incidence d'apparition de tumeurs pulmonaires est aussi remarquée chez les souris transgéniques âgées de plus de 10 mois (tableaux 1A et 1B). À partir de cet âge, des tumeurs situées à la surface des poumons des souris transgéniques sont visibles (figure 10D). Chez les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like, les tumeurs pulmonaires se développent tardivement comme c'est le cas chez les grands fumeurs qui ne les développent que 15 à 25 ans après le début du tabagisme. Il est intéressant de noter que chez les fumeurs, le gène RAR $\beta$  serait inactivé et/ou délété dès le stade prénéoplasique. (Wang *et al.*, 1999).

Dans le tableau 1, nous pouvons remarquer que l'incidence d'apparition de tumeurs pulmonaires diffère largement entre les diverses lignées de souris transgéniques portant le même transgène. Cela s'explique par le fait que les souris des différentes lignées ne portent pas le même nombre de copies du transgène dans leur génome. Dans cet ordre d'idée, les souris transgéniques de la lignée 1003 portent 2 copies du transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 dans leur génome alors que les souris transgéniques de la lignée 1002 en portent une seule copie (Bérard *et al.*, 1996). Dans les lignées de souris transgéniques porteuses de la construction AS-RAR $\beta$ 2, la lignée 422 est celle qui a le plus de copie du transgène, suivie de la lignée 426 et 432 (Bérard *et al.*, 1996). Pour la construction RAR $\beta$ 4-like, la lignée 32 porte environ 10 copies du transgène comparativement à une seule copie pour la lignée 5005 (Bérard *et al.*, 1994). La lignée 32 est donc celle qui exprime le plus le transgène. Il est intéressant de constater qu'il y'a une corrélation



entre le niveau d'expression du transgène et l'incidence d'apparition des cancers pulmonaires.

Des modèles animaux pour RAR $\beta$  ont aussi été générés dans d'autres laboratoires par invalidation de gènes (Chambon, 1994; Massaro *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 1995; Mendelson *et al.*, 1994). Ces modèles donnent des résultats qui diffèrent largement de ceux obtenus avec les modèles d'animaux transgéniques que nous utilisons. Par exemple, les souris transgéniques subissant une invalidation ciblant le gène complet de RAR $\beta$  (Luo *et al.*, 1995) ou uniquement l'isoforme RAR $\beta$ 2 (Mendelson *et al.*, 1994) ne développent pas de cancers pulmonaires. Dans ces souris, il y a perte complète de l'expression de l'une ou de toutes les isoformes de RAR $\beta$ . L'hypothèse pouvant expliquer ce phénomène a été discuté par Bérard *et al.* (1996). Ainsi, lorsque le taux d'expression des protéines ciblées (RAR $\beta$ ) atteint un certain seuil critique, des mécanismes de compensation, encore mal identifiés, s'enclenchent et compensent l'effet de la perte de l'expression des isoformes de ce récepteur nucléaire. Chez les trois modèles de souris transgéniques que nous utilisons, ces mécanismes de compensation sont absents ou insuffisants pour remédier à la perte de l'expression des différentes isoformes de RAR $\beta$ , expliquant l'augmentation de l'incidence des cancers pulmonaires chez ces souris.

Il est reconnu, comme mentionné auparavant, que les isoformes de RAR $\beta$  ont un grand spectre d'action (Le Moigne, 1997; Raz et Kelley, 1997; Rogers, 1997; Liaudet-Coopman *et al.*, 1997; Oikawa *et al.*, 1989; Bérard *et al.*, 1997; Pfitzner *et al.*, 1998). Ainsi, lorsque l'expression de ces isoformes est dérégulée, des effets importants au niveau de chaque cellule affectée sont remarqués. Entre autres, le patron d'expression

des gènes Hox est fortement modifié tel que nous le voyons par les résultats que nous avons obtenus à ce sujet.

En effet, au cours de mon projet de maîtrise nous avons vérifié si les gènes Hox du groupe B sont déréglés dans leur expression lorsque nous altérons les niveaux d'expression des isoformes de RAR $\beta$  comme c'est le cas dans les cancers pulmonaires chez l'humain. Nous avons vérifié cette hypothèse à l'aide des modèles de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like. Ce faisant, nous avons déterminé par immunofluorescence et microscopie confocale, le niveau d'expression des protéines Hoxb-2, Hoxb-3 et Hoxb-4 au niveau des tumeurs pulmonaires ainsi qu'au niveau des cellules de Clara et des pneumocytes de type II. Chez l'humain, les cellules de Clara et les pneumocytes de type II sont soupçonnés d'être à l'origine de la majorité des cancers pulmonaires (Thaete et Malkinson, 1991; Gazdar *et al.*, 1990). Au niveau de chaque type cellulaire, nous avons mesuré l'intensité moyenne des pixels et compilé les résultats afin de faire des calculs statistiques. Dans certains cas, nous avons aussi vérifié si la localisation intracellulaire de ces protéines était modifiée.

Nos résultats montrent que l'expression de la protéine Hoxb-2 diminue dans la majorité des tissus pulmonaires provenant des souris transgéniques comparée aux résultats obtenus chez les souris témoins. En effet, nous observons une diminution du signal d'immunofluorescence de Hoxb-2 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales chez les souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 (lignées 1002 et 1003), AS-RAR $\beta$ 2 (422, 426 et 432) face au signal d'immunofluorescence remarqué chez les souris témoins. Chez les souris transgéniques RAR $\beta$ 4-like (lignées 32 et 5005), nous voyons une diminution du signal

d'immunofluorescence au niveau des cellules de Clara et des cellules tumorales comparativement à celui retrouvé chez les souris témoins au niveau des cellules de Clara. Ces résultats nous portent à croire que si l'expression des isoformes de RAR $\beta$  est affectée chez nos souris transgéniques, l'expression de Hoxb-2 est également diminuée.

Nos résultats montrent aussi que de façon générale, l'expression de la protéine Hoxb-3 augmente dans les tissus pulmonaires chez les souris transgéniques que nous utilisons face à l'expression remarquée chez les souris témoins. Effectivement, le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 augmente au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules tumorales chez les souris des lignées transgéniques 1002, 1003 et 422. Chez les souris de la lignée 426, le signal augmente au niveau des cellules de Clara et des pneumocytes de type II alors que chez les souris de la lignée 32, nous détectons une augmentation du signal d'immunofluorescence au niveau des cellules de Clara et des cellules tumorales comparativement au signal retrouvé au niveau des pneumocytes de type II ou des cellules de Clara du tissu témoin. Chez les souris de la lignée 5005, nous détectons une augmentation du signal d'immunofluorescence uniquement au niveau des cellules de Clara et des cellules tumorales comparées au signal obtenue au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins. Chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 et AS-RAR $\beta$ 2, nous détectons aussi une importante relocalisation du signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-3 dans les cellules de Clara et les pneumocytes de type II au niveau nucléaire. Nos résultats nous portent à croire qu'il y a perte de localisation nucléaire de Hoxb-3 au niveau des tumeurs pulmonaires chez ces souris, cependant, nous devons confirmer ces résultats par une coloration des noyaux. Nous devons aussi vérifier si ce

phénomène de relocalisation nucléaire de la protéine Hoxb-3 est aussi remarqué chez les souris portant le transgène RAR $\beta$ 4-like. Nos résultats indiquent de façon générale que lorsque l'expression des isoformes RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 3 est affectée à la baisse ou que l'expression de RAR $\beta$ 4 est augmentée, l'expression de la protéine Hoxb-3 est augmentée dans les cellules de Clara, les pneumocytes de type II et les cellules tumorales.

Pour la protéine Hoxb-4, nos résultats montrent que son expression est variable selon la lignée de souris transgénique étudiée. Le signal d'immunofluorescence de la protéine Hoxb-4 diminue chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3 au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et des cellules tumorales (comparativement au signal obtenu au niveau des cellules de Clara ou des pneumocytes de type II chez les souris témoins), alors qu'il augmente au niveau des cellules tumorales chez les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 (comparativement au signal obtenu au niveau des cellules de Clara chez les souris témoins). Chez les souris portant le RAR $\beta$ 4-like, une diminution au niveau des cellules tumorales chez les souris des lignées 32 et 5005 est remarquée comparativement au signal observé au niveau des cellules de Clara ou des pneumocytes de type II chez les souris témoins.

Par ailleurs, des collègues ont aussi étudié l'expression des gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-2*, *Hoxa-4*, *Hoxa-5*, *Hoxa-7* et *Hoxb-1* révèle une dérégulation importante dans l'expression de ces gènes au niveau des cellules de Clara, des pneumocytes de type II et au niveau des tumeurs pulmonaires. Par exemple, le gène de *Hoxb-1*, qui n'est normalement pas exprimé au niveau pulmonaire chez les souris adultes, est exprimé de

façon ectopique dans les poumons et dans les tumeurs pulmonaires analysées des modèles de souris transgéniques AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3, AS-RAR $\beta$ 2 et RAR $\beta$ 4-like.

Ainsi, comme nous pouvons le remarquer, l'expression des gènes *Hox* est fortement affectée chez nos modèles de souris transgéniques au cours du processus de tumorigenèse pulmonaire induit par un dérèglement de l'expression de RAR $\beta$ . Dans certains cas, nous remarquons une perte d'expression dans les tissus provenant de souris transgéniques (par exemple *Hoxb-2* et *Hoxb-4* chez les souris AS-RAR $\beta$ 1/ $\beta$ 3). Nous remarquons aussi un gain d'expression de certains gènes *Hox* (par exemple *Hoxb-3* et *Hoxb-4* chez les souris AS-RAR $\beta$ 2) et même un cas d'expression aberrante d'un gène *Hox* (*Hoxb-1*). Un phénomène particulier est aussi remarqué : le patron d'activation et d'expression des gènes *Hox* est affecté. Normalement, les gènes *Hox* d'un même complexe s'autoactivent de façon séquentielle tel que remarqué dans une lignée de cellules embryonnaires (Flagiello *et al.*, 1997). Ainsi, en ayant une activation aberrante de l'expression de la protéine *Hoxb-1*, une augmentation dans l'expression de plusieurs gènes *Hox* devrait être remarquée alors qu'en fait ce n'est pas le cas. Par exemple, le gène de *Hoxb-2*, étant sur le même complexe que *Hoxb-1*, devrait être directement activé par ce dernier mais il est inhibé au niveau des poumons des souris transgéniques. Les raisons de cette dérégulation du patron d'activation des gènes *Hox* restent obscures, mais d'autres facteurs protéiques doivent être impliqués.

Bien que les résultats que nous avons présentement sur la dérégulation des gènes *Hox* ne nous permettent pas de tirer des conclusions quand à leurs rôles dans le processus de tumorigenèse pulmonaire, nous pouvons cependant émettre deux hypothèses soit : la dérégulation des gènes *Hox* pourrait 1- participer activement au

processus de tumorigenèse pulmonaire, ou encore 2- pourraient jouer un rôle protecteur en ralentissant ce processus.

Premièrement, plusieurs raisons nous suggèrent que les gènes Hox participent activement dans le processus du développement des tumeurs pulmonaires. Nous savons que les protéines Hox ont la capacité d'influencer plusieurs processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation cellulaires (Bromleigh et Freedman, 2000), l'apoptose (Izon *et al.*, 1998) et l'angiogenèse (Boudreau *et al.*, 1997), tous ces processus étant reconnus pour être impliqués dans la tumorigenèse (Salgia et Skarin, 1998). De plus, plusieurs équipes de recherches ont démontré le caractère oncogénique de la dérégulation de plusieurs gènes Hox comme *Hoxa-9* (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001), *Hoxb-3* (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001; Krosi *et al.*, 1998), *Hoxb-4* (Krosi et Sauvageau, 2000; Krosi *et al.*, 1998), *Hoxb-8* (Perkins et Cory, 1993; Aberdam *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1990), ainsi que pour *Hoxa-1*, *Hoxa-5*, *Hoxa-7*, *Hoxb-7* et *Hoxc-8* (Maulbecker et Gruss, 1993). Ces gènes ont en effet la capacité de transformer des cellules en culture.

Parmi les gènes *Hox* que nous avons étudiés, le gène *Hoxb-1* serait un candidat important parmi ceux pouvant manifester des propriétés oncogéniques. En effet, dans les poumons de souris normales, le gène *Hoxb-1* n'est pas exprimé alors que dans tous nos modèles de souris transgéniques, le gène *Hoxb-1* est exprimé de façon ectopique. En effet, l'ARNm et la protéine de *Hoxb-1* sont détectés dans les poumons de tous nos modèles de souris transgéniques (résultats antérieurs, article en préparation). Chez l'humain, une expression ectopique de la protéine HOXB-1 a aussi été observée au niveau protéique dans 70% des adénocarcinomes pulmonaires étudiés de même que

dans des lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaires (Delabre *et al.*, en préparation). De plus, certaines évidences suggèrent que le gène *Hoxb-1* contrôle directement ou indirectement l'expression de différents gènes reconnus pour être impliqués dans les cancers. Entre autres, *Hoxb-1* a la capacité de contrôler l'expression du gène sonic hedgehog (*Shh*), via les protéines Pax-6 (Mikkola *et al.*, 2001) et/ou *Otx2* (Guazzi *et al.*, 1998). Le gène *Shh* est reconnu pour avoir un effet important dans la prolifération cellulaire (Fan et Khavari, 1999). L'expression de la protéine du rétinoblastome (pRB), reconnue comme suppresseur de tumeurs (Paggi *et al.*, 1996), est aussi contrôlée par Pax-6 (Cvekl *et al.*, 1999) qui est elle même, comme spécifié ci-haut, contrôlée par *Hoxb-1*. Ensuite, l'expression du gène *EphA2*, ayant la capacité d'affecter l'angiogenèse (Ogawa *et al.*, 2000), est aussi contrôlé directement par *Hoxb-1* (Chen et Ruley, 1998). Finalement, la protéine *Hoxb-1* a la capacité de contrôler l'expression des facteurs de transcription GATA (*GATA-1*, *GATA-2* et *GATA-3*; Pata *et al.*, 1999). Ces facteurs de transcription sont reconnus pour affecter la prolifération cellulaire (Tsai et Orkin, 1997) et ont possiblement la capacité de contrôler l'expression de la protéine p53 (Tsai et Orkin, 1997) et de la cycline D3 (Wang *et al.*, 1996).

La protéine *Hoxb-2*, via sa surexpression chez nos différents modèles de souris transgéniques, pourrait promouvoir le développement de cancers pulmonaires. Cependant, les gènes cibles contrôlés par *Hoxb-2* nous sont encore inconnus. D'autres études devront être conduites afin de déterminer si la surexpression de *Hoxb-2* revêt un caractère oncogénique et, si c'est le cas, déterminer quels sont les différents gènes cibles contrôlés par ce facteur de transcription qui sont susceptible de favoriser le processus de tumorigenèse pulmonaire. Ces études pourront être effectuées grâce à la transfection

d'un vecteur d'expression contenant la séquence de l'ADNc de *Hoxb-2* dans des cellules pulmonaires en culture.

Finalement, la surexpression du gène *Hoxb-4* chez les souris transgéniques portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 pourrait aussi favoriser le développement des cancers pulmonaires. En effet, les souris portant le transgène AS-RAR $\beta$ 2 sont de façon générale plus susceptible au développement de cancers pulmonaires que les autres lignées de souris transgéniques où le gène de *Hoxb-4* n'est pas surexprimé. Cette caractéristique pourrait être expliquée par le fait que *Hoxb-4* a la capacité de contrôler l'expression de la cycline D1 via le complexe AP-1 (Kros1 et Sauvageau, 2000). La cycline D1 est une protéine exprimée en début de la phase G1 au cours du cycle cellulaire et qui permet à la cellule d'entamer le processus de division cellulaire lorsqu'elle est associée à la protéine kinase CDK 4/6, (Rodriguez-Puebla *et al.*, 1999). la protéine *Hoxb-4* favoriserait donc la prolifération cellulaire lorsqu'elle est surexprimée. Enfin, il est aussi reconnu que le gène de *Hoxb-4* a la capacité de transformer les cellules Rat-1 en culture (Kros1 et Sauvageau, 2000), démontrant ainsi le caractère oncogénique de sa surexpression.

Deuxièmement, la dérégulation de l'expression de certains gènes *Hox* peut aussi avoir un rôle protecteur en ralentissant le processus de tumorigenèse pulmonaire induit suite au dérèglement de la voie de signalisation des rétinoïdes. D'ailleurs à ce sujet, Cillo (1995) suggère que l'organisation du patron d'expression des gènes *Hox* dans les poumons jouerait un rôle semblable à celui des gènes onco-suppresseurs (Tiberio *et al.*, 1994; Cillo, 1995). D'autant plus que le gène onco-supresseur *mg1-1* a été identifié comme une des cibles de *Hoxc-8* (Tomotsune *et al.*, 1993), suggérant que certains gènes



Hox peuvent affecter l'expression de gènes onco-suppresseurs. De ce fait, l'expression du gène onco-suppresseur p53, tel que suggéré par Raman *et al.* (2000), serait affectée par la protéine HOXA-5 chez l'humain.

Parmi les gènes *Hox* que nous avons étudiés, la surexpression du gène *Hoxb-3* lors du processus de tumorigenèse pulmonaire pourrait jouer un rôle antitumoral. En effet, la protéine Hoxb-3 est augmentée dans son expression en plus d'être relocalisée au niveau nucléaire dans les cellules de Clara et les pneumocytes de type II chez la majorité des souris transgéniques que nous utilisons. Cependant, la protéine Hoxb-3 semble être relocalisée au niveau cytoplasmique dans les cellules tumorales chez ces souris et la protéine sera ainsi incapable de remplir son rôle dans ces cellules. Il est donc possible de poser l'hypothèse suivante : tant que Hoxb-3 est fortement exprimée, les cellules affectées par une diminution de l'expression des récepteurs RAR $\beta$  sont en partie protégées contre certains dérèglements cellulaires sévères pouvant conduire à une transformation cellulaire. Nous pensons que ces cellules sont en partie protégées car elles sont tout de même hyperplasiques. Lorsque l'expression de Hoxb-3 est perdue (ou relocalisée dans le cytoplasme), cela pourrait signifier la perte de ce système de protection permettant ainsi aux cellules de progresser dans le processus de tumorigenèse pulmonaire. De plus, Hoxb-3 est impliqué dans la régulation de l'expression des protéines du surfactant pulmonaire (Gagné *et al.*, article en préparation). Les protéines du surfactant sont souvent utilisées comme un marqueur de différenciation des pneumocytes de type II et des cellules de Clara (Chang et Szabo, 2000). Lorsqu'il y a perte de l'expression de Hoxb-3, nous avons perte de l'expression des protéines du surfactant et perte de l'identité cellulaire. La perte de l'identité cellulaire est souvent

associé avec le stade d'évolution des cancers et leur degré de différenciation chez l'humain (Hertel *et al.*, 2002; Stremmel *et al.*, 2002).

La perte de l'expression de la protéine Hoxb-4 chez les souris transgéniques des lignées 1002 et 1003 pourrait aussi avoir un rôle protecteur contre le développement des tumeurs pulmonaires chez ces souris. Tel que spécifié ci-haut, Hoxb-4 a la capacité de contrôler l'expression de la cycline D1 et de transformer des cellules surexprimant cette protéine Hox. Ainsi, en diminuant l'expression de Hoxb-4, nous diminuons possiblement l'expression de la cycline D1, et la prolifération cellulaire est ainsi ralentie. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les souris des lignées 1002 et 1003 prennent plus de temps avant de développer des tumeurs pulmonaires que les autres lignées de souris transgéniques où l'expression de Hoxb-4 est peu affectée (lignées 32 et 5005) ou qu'elle est fortement augmentée (lignées 422, 426 et 432). Afin de vérifier le caractère protecteur des gènes *Hoxb-3* et *Hoxb-4*, nous devons diminuer l'expression de Hoxb-4 ou augmenter l'expression de Hoxb-3 dans des cellules de poumons provenant de nos modèles de souris transgéniques (pneumocytes de type II en culture) et vérifier s'il y a diminution de la prolifération cellulaire lorsque nous modulons l'expression de ces gènes.

Le rôle anti-tumoral joué par certains gènes *Hox* clés pourrait expliquer pourquoi nos différents modèles de souris transgéniques ne démontrent pas de symptômes d'hyperplasie avant l'âge de 8 mois et ne développent pas de tumeurs pulmonaires avant l'âge de 10 mois même si l'expression des différentes isoformes de RAR $\beta$  est déjà fortement affectée. Nous avons commencé d'ailleurs à vérifier cette hypothèse en analysant le cycle cellulaire des pneumocytes de type II extrait des poumons de jeunes

souris transgéniques et témoins âgées de moins de 8 mois. Les résultats préliminaires semblent effectivement indiquer que le cycle cellulaire des cellules extraites de souris transgéniques est ralenti comparativement au cycle cellulaire des pneumocytes de type II extraits de souris témoins. Cependant, d'autres études devront être faites afin de confirmer statistiquement ces résultats. Nous devons aussi vérifier si le cycle cellulaire est modifié lorsque les souris vieillissent. Chez les souris plus âgées, le cycle cellulaire des cellules provenant de souris transgéniques serait grandement accéléré au fur et à mesure que les mécanismes de protection contrôlés par certains gènes *Hox* seront perdus, expliquant ainsi les symptômes d'hyperplasie rencontrés chez les souris âgées de plus de 8 mois. Finalement, nous devons vérifier si les changements de niveau d'expression de certains gènes *Hox* peuvent ralentir la vitesse de prolifération cellulaire chez les jeunes souris transgéniques.

Afin de pouvoir déterminer le rôle que jouent les gènes *Hox* dans le processus de la tumorigenèse pulmonaire, nous voulons modifier l'expression des gènes *Hox* dans des cellules. Afin de pouvoir faire ces études dans des modèles cellulaires appropriés et avoir un effet ressemblant le plus près à la réalité rencontrée au niveau pulmonaire, nous avons décidé de faire ces analyses au niveau de pneumocytes de type II fraîchement prélevés de souris témoins ou transgéniques. De cette façon, nous pourrions vérifier entre autre, au niveau de cellules provenant de souris normales, ce qui se passe lorsque nous dérégulons l'expression des gènes *Hox* par des vecteurs portant une séquence antisens contre un gène *Hox* cible ou en induisant une surexpression d'un gène *Hox* par un vecteur d'expression portant la séquence sens du gène. Nous pourrions aussi vérifier

l'effet du rétablissement des niveaux d'expression des gènes *Hox* dans les pneumocytes provenant de souris transgéniques.

J'ai dû mettre au point une technique de purification des pneumocytes de type II. À cette fin, nous nous sommes inspiré de la technique de purification des pneumocytes de type II mise au point par l'équipe de Myriam Corti (Corti *et al.*, 1996). Les cellules du système immunitaire contaminantes ont été ciblées à partir d'un seul anticorps couplé avec des particules magnétique (anti cd-45) au lieu de deux (anti cd-45 couplé à la biotine et anti cd-32 couplé à la biotine). Les cellules marquées ont alors été passées sur une colonne de fer en présence d'un aimant (système MACS). Les cellules contaminantes sont ainsi retenues par la colonne et les pneumocytes de type II sont récupérés à la sortie de la colonne. Cette méthode semblait mieux adaptée que celle suggérée par l'équipe de Myriam Corti. Lorsque nous avons vérifié la pureté des pneumocytes de type II purifiés par la technique que nous avons mis au point, nous avons obtenue une pureté des pneumocytes d'environ 70%, ce qui correspond à ce qui est obtenue par l'équipe de Myriam Corti.

Pour la mise en culture des pneumocytes de type II, nous avons utilisé un milieu de culture différent. L'équipe de Myriam Corti (Corti *et al.*, 1996) a utilisé un simple milieu de DMEM supplémenté par du sérum de veau foetal. Cependant, les pneumocytes de type II dans ce milieu de culture perdent rapidement leurs caractéristiques morphologiques et se transforment de façon terminale en pneumocytes de type I. Tel que suggéré Kumar *et al.*, 1995, l'utilisation du milieu de culture MCDB-201 modifié palie à ce problème en assurant une meilleure survie des cellules, et retarde la différenciation des pneumocytes de type II en pneumocytes de type I (Kumar *et al.*,

1995). Selon cette équipe de recherche, la présence de sérum de veau foetal induit la différenciation des pneumocytes de type II en type I. Le sérum de veau foetal a donc été enlevé du milieu de culture. Le milieu de culture MCDB-201 a aussi été complété en acides gras libres afin de palier à la demande importante en acides gras des pneumocytes de type II nécessaire à la production du surfactant pulmonaire.

Comme spécifié auparavant, nous voulons utiliser ces cellules afin de vérifier l'effet de l'âge des souris transgéniques et le niveau d'expression de certains gènes *Hox* sur la prolifération cellulaire. Nous voulons aussi vérifier par la technique de l'immunobuvardage (western blot) le niveau d'expression des protéines Hox dans les pneumocytes de type II purifiés et confirmer, entres autres, les résultats que nous avons obtenus par la technique d'immunofluorescence et de l'analyse d'images par microscopie confocale. Nous pourrons vérifier par le fait même si il y a des modifications faites sur les protéines Hox (phosphorylation et autres).

## **6. Conclusion**

En conclusion, nous pouvons affirmer que le dérèglement de l'expression des isoformes des récepteurs à l'acide rétinoïque RAR $\beta$  est responsable de l'augmentation de l'incidence d'apparition de tumeurs pulmonaires chez nos souris transgéniques. Chez ces souris, nous remarquons aussi un dérèglement de l'expression de plusieurs gènes *Hox* au niveau des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et au niveau des cellules cancéreuses dans les poumons de nos souris transgéniques lorsque nous comparons avec des souris témoins. L'effet de la dérégulation de ces gènes dans le processus de tumorigenèse pulmonaire reste encore inconnu, mais nous soupçonnons que certains de ces gènes auront un effet pro-tumoral alors que d'autres gènes auront un effet anti-tumoral. La balance entre l'expression de ces différents gènes pourrait expliquer pourquoi les souris de moins de 6 mois semblent parfaitement normales, alors que les souris de plus de 8 mois démontrent des symptômes d'hyperplasie et développent des tumeurs pulmonaires lorsqu'il y a perte de l'effet anti-tumoral exercé par certains gènes *Hox*. Nous avons aussi mis au point une technique de purification de pneumocytes de type II extraits des poumons de souris transgéniques ou témoins. Ceci permettra d'utiliser ces cellules afin de vérifier l'effet de l'âge sur la prolifération cellulaire des pneumocytes de type II chez les souris transgéniques et chez les souris témoins. Ceci nous permettra aussi de déterminer le rôle des gènes *Hox* sur la prolifération cellulaire des pneumocytes de type II par des essais de transfections transitoires avec des vecteurs antisens ou sens contre certains gènes *Hox*. Enfin, ceci permettra de mettre au point des lignées de pneumocytes de type II conditionnellement immortalisées identifier les gènes cibles contrôlés par ces gènes *Hox* et d'étudier les

mécanismes moléculaires du contrôle de l'expression de certains promoteurs comme par exemple celui de *Hoxb-1*.



## 7. Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de maîtrise, Jacques Bérard, pour m'avoir permis de faire ma maîtrise sous sa direction. Ses encouragements et ses conseils lors de moments difficiles à passer m'ont permis de terminer cette maîtrise avec succès.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire Jean-François Delabre et Hugo Garneau pour leur aide, leur encouragement et l'amitié que j'ai pu développer avec eux.

Je tiens à remercier tous mes correcteurs, Jean-François Delabre, Sébastien Lévesque, Jacques Bérard et mon père Jean Bellehumeur ainsi que les membres de mon jury de mémoire soit les Drs. Gilles Dupuis et Danielle Jacques. Sans eux, ce mémoire ne serait pas ce qu'il est.

Je remercie aussi tout particulièrement Ghassan Bkaily Jr., Denis Martel et Dr. Léonid Volkov pour leur aide précieuse au cours de ma maîtrise pour la microscopie confocale, la cytométrie et l'immunofluorescence.

## 8. Références

- Aberdam D., Negreanu V., Sachs L. et Blatt C., (1991). The oncogenic potential of an activated Hox-2.4 homeobox gene in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 11 : 554-557.
- Alland L., Muhle R., Hou H., jr, Potes J., Chin L., Schreiber-Abus N. et DePinho R., (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*. 387: 49-55.
- Bardot O., Aldridge T.C., Latruffe N. et Green S., (1993). PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 192 : 37-45.
- Bastien J., Adam-Stitah S., Riedl T., Egly J.M., Chambon P. et Rochette-Egly C., (2000). TFIID interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylate its AF-1-activating domain through cdk7. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 : 21896-21904.
- Bavinck J.N., Tieben L.M., Van Der Woude F.J., Tegzess A.M., Hermans J., ter Schegget J.T. et Vermeer B.J., (1995). Prevention of skin cancer and reduction of keratotic skin lesion during acitretin therapy in renal transplant recipients: a double-blind, placebo controlled study. *Journal of Clinical Oncology*. 13 : 1933-1938.
- Beamer B.A., Negri C., Yen C.J., Gavrilova O., Rumberger J.M., Durcan M.J., Yarnall D.P., Hawkins A.L., Griffin C.A., Burns D.K., Roth J., Reitman M. et Shuldiner A.R., (1997). Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 233 : 756-759.
- Belinsky S.A., Lechner J.F. et Johnson N.F., (1995). An improved method for the isolation of type II and Clara cells from mice. *In Vitro Cellular Developmental Biology*. 31 : 361-366.
- Benachenhou N., Guiral S., Gorska-Flipot I., Labuda D. et Sinnott D., (1998). High resolution deletion mapping reveals frequent allelic losses at the DNA mismatch repair loci hHMLH1 and hMSH3 in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 77 : 173-180.
- Benazzouz A. et Duprey P., (1999). The vimentin promoter as a tool to analyse the early events of retinoic acid-induced differentiation of cultured embryonal carcinoma cells. *Differentiation*. 65 : 171-180.
- Benbrook D., Lernhardt W. et Pfahl M., (1988). A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature*. 333 : 669-672.

Bérard J., Gaboury L., Landers M., De Repentigny Y., Houle B., Kothary R. et Bradley W. E.C., (1994). Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR beta 4-like transgene. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 13 : 5570-5580.

Bérard J., Laboune L., Mukuna M., Massé S., Kothary R. et Bradley W.E.C., (1996). Lung tumors in mice expressing an antisens RAR $\beta$ 2 transgene. *FASEB Journal*. 10 : 1091-1097.

Berard J., Luo H., Chen H., Mukuna M., Bradley W.E. et Wu J., (1997). Abnormal regulation of retinoic acid receptor beta2 expression and compromised allograft rejection in transgenic mice expressing antisens sequences to retinoic acid receptor beta1 and beta3. *The Journal of Immunology*. 159 : 2586-2598.

Berrodin T.J., Marks M.S., Ozato K., Linney E. et Lazar M.A., (1992). Heterodimerisation among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumine upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Molecular Endocrinology*. 6 : 1468-1478.

Black B.E., Holaska J.M., Rastinejad F. et Paschal B.M., (2001). DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Current Biology*. 11 : 1749-1758.

Blatt C., Aberdam D., Schwartz R. et Sachs L., (1988). DNA rearrangement of a homeobox gene in myeloid leukaemic cells. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 7 : 4283-4290

Blatt C. et Sachs L., (1988). Deletion of a homeobox gene in myeloid leukemias with a deletion in chromosome 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 156 : 1265-1270.

Bogue C.W., Gross I., Vasavada H., Dynia D.W., Wilson C.M. et Jacobs H.C., (1994). Identification of *Hox* genes in newborn lung and effects of gestational age and retinoic acid on their expression. *American Journal of Physiology*. 266: L448-L454

Boudreau N., Andrews C., Srebrow A., Ravanpay A. et Cherest D.A., (1997). Induction of the angiogenic phenotype by hox d3. *The Journal of Cell Biology*. 139 : 257-264.

Boulaire J. Fotedar A. et Fotedar R., (2000). The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathologie-Biologie (Paris)*. 48 : 190-202.

Brambilla E., Lantuejoul S. et Sturm N., (2000). Divergent differentiation in neuroendocrine lung tumors. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 17 : 138-148.

Brand N., Petkovich M., Krust A., de Thé H., Marchio A., Tiollais P. et Dejean D., (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*. 332 : 850-853.

Britton M., (2002). The epidemiology of mesothelioma. *Seminars in Oncology*. 29 : 18-25.

Bromleigh V.C. et Freedman L.P., (2000). p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes and Development*. 14 : 2581-2586.

Bucan M., Yang-Feng T., Colberg-Poley A.M., Wolgemuth D.J., Guenet J.L., Francke U. et Lehrach H., (1986). Genetic and cytogenetic localisation of the homeo box containing genes on mouse chromosome 6 and human chromosome 7. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 5 : 2899-2905.

Burbee D.G., Forgacs E., Zochbauer-Muller S., Shivakumar L., Fong K., Gao B., Randle D., Kondo M., Virmani A., Bader S., Sekido Y., Latif F., Milchgrub S., Toyooka S., Gazdar A.F., Lerman M.I., Zbarovsky E., White M. et Minna J.D., (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of the National Cancer Institute*. 93 : 691-699.

Butler A.J. et Parker M.G., (1995). COUP-TF II homodimers are formed in preference to heterodimers with RXR alpha or TR beta in intact cells. *Nucleic Acids Research*. 23 : 4143-4150.

Carlberg C., Quack M., Herdick M., Bury Y., Polly P. et Toell A., (2001). Central role of VDR conformations for understanding selective actions of vitamin D(3) analogues. *Steroids*. 66 : 213-221.

Calvo K.R., Knoepfler P., McGrath S. et Kamps M.P. (1999). An inhibitory switch derepressed by Pbx, Hox and Meis/Prep1 partners regulates DNA-binding by Pbx1 and E2a-Pbx1 and is dispensable for myeloid immortalization by E2a-Pbx1. *Oncogene*. 18 : 8033-8043.

Celetti A., Barba P., Cillo C., Rotoli B., Boncinelli E. et Magli M.C., (1993). Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia. *International Journal of Cancer*. 53 : 237-244.

Chambon P., (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*. 10 : 940-954.

Chambon P., (1994). The retinoid signaling pathway : molecular and genetic analyses. *Seminars in Cell Biology*. 5 : 115-125.

Chang T.H. et Szabo E., (2000). Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*. 60: 1129-1138.

Chariot A. et Castronovo V., (1996). Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 222 : 292-297.

Chaturvedi S. et Chaturvedi S., (2001). Carcinogenicity of asbestos: convincing evidence, conflicting interests. *National Medical Journal of India*. 14: 43-46.

Chen H., Berard J., Luo H., Landers M., Vinet B., Bradley W.E. et Wu J., (1997). Compromised allograft rejection response in transgenic mice expressing antisense sequences to retinoic acid receptor beta2. *The Journal of Immunology*. 48 : 157-162.

Chen J. et Ruley H.E., (1998). An enhancer element in the *EphA2* (*Eck*) gene sufficient for rhombomere-specific expression is activated by HOXA1 and HOXB1 homeobox proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 : 24670-24675.

Cheskis B., et Freedman L.P., (1994). Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D3 receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Molecular and Cellular Biology*. 14 : 3329-3338.

Chung J., Liu C., Smith D.E., Seitz H.K., Russell R.M. et Wang X.D., (2001). Restoration of retinoic acid concentration suppresses ethanol-enhanced c-jun expression and hepatocyte proliferation in rat liver. *Carcinogenesis*. 22: 1213-1219.

Cillo C., (1995). Hox genes in human cancers. *Invasion Metastasis*. 14 : 38-49.

Cillo C., Barba P., Freschi G., Bucciarelli G., Magli M.C. et Boncinelli E., (1992). HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *International Journal of Cancer*. 51 : 892-897

Cillo C., Faiella A., Cantile M. et Boncinelli E., (1999). Homeobox genes and cancer. *Experimental Cell Research*. 248 : 1-9.

Clagett-Dame M. et Plum L. A., (1997). Retinoids-regulated gene expression in neural development. *Critical Reviews in Eukariotic Gene Expression*. 7 : 299-342.

Cohn M.J., Patel K., Krumlauf R., Wilkinson D.G., Clarke J.D. et Tickle C., (1997). Hox9 genes and vertebrate limb specification. *Nature*. 387 : 97-101.

Cook J.R., Hill D.A., Humphrey P.A., Pfeifer J.D. et El-Mofly S.K., (2000). Squamous cell carcinoma arising in recurrent respiratory papillomatosis with pulmonary involvement emerging common pattern of clinical features and human papillomavirus serotype association. *Modern Pathology*. 13: 914-918.

Corti M., Brody A.R. et Harrison J.H., (1996). Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 14 : 309-315.

Cote S. et Momparler R.L., (1997). Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 8 : 56-61

Crestani B. et Aubier M. (1995). Les pneumocytes II sont les défenseurs de l'alvéole; Ils participent au maintien de son intégrité structurale et fonctionnelle. *La revue du praticien*. 45 : 2124-2126.

Crowe D.L., (1998). Retinoic acid receptor beta induces terminal differentiation of squamous cell carcinoma lines in the absence of cyclin-dependant kinase inhibitor expression. *Cancer Research*. 58 : 142-148.

Cvekl A., Kashanchi F., Brady J.N. et Piatigorsky J., (1999). Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 40 : 1343-1350.

Czeczuga-Semeniuk E., Wolczynski S., Dzieciol J., Dabrowska M., Anchim T. et Tomaszewska I., (2001). 13-cis retinoic acid and all-trans retinoic acid in the regulation of the proliferation and survival of human breast cancer cell line MCF-7. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 6: 925-939.

Dammann R., Li C., Yoon J.H., Chin P.L., Bates S. et Pfeifer G.P., (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics*. 25 : 315-319.

De Vita G, Barba P., Odartchenko N., Givel J.C., Freschi G., Bucciarelli G., Magli M.C., Boncinelli E. et Cillo C., (1993). Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 29A : 887-893.

Dejean A., Bougueleret L., Grzeschik K.H. et Tiollais P., (1986). Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature*. 322 : 70-72.

Di Rocco G., Mavilio F. et Zappavigna V., (1997). Fonctionnal dissection of a transcriptionnally active, target-specific Hox-Pbx complex. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 16 : 3644-3654.

Drabkin H.A., West J.D., Hotfilder M., Heng Y.M., Erickson P., Calvo R., Dalmau J., Gemmill R.M. et Sabtilzky F., (1999). Def-3(g16/NY-LU-12), an RNA binding protein from the 3p21.3 homozygous deletion region in SCLC. *Oncogene*. 18 : 2589-2597.

- Droste J. H., Weyler J. J., Van Meerbeeck J. P., Vermeire P. A. et van Sprundel M. P. (1999). Occupational risk factors of lung cancer: a hospital based case-control study. *Occupationnal and Environmental Medecine*. 56 : 322-327.
- Fan H. et Khavari P.A., (1999). Sonic Hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *Journal of Cellular Biology*. 147 : 71-76.
- Fenaux P., Chomienne C. et Degos L., (2001). All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelcytic leuk emia. *Seminars in Hematology*. 38 : 13-25.
- Ferretti E., Marshall H., Pöpperl H., Maconochie M., Krumlauf R. et Blasi F., (2000). Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development*. 127 : 155-166.
- Flagiello D., Gibaud A., Ditrillaux B., Poupon M.F. et Malfoy B., (1997). Distinct patterns of all-*trans* retinoic acid dependent expression of *HOXB* and *HOXC* in human embryonal and small-cell lung carcinoma cell lines. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 415 : 263-267.
- Folkers G.E., Van Der Burg B. et Van Der Saag P.T., (1996). A role for cofactors in synergistic and cell-specific activation by retinoic acit receptors and retinoic X receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 56 : 119-129.
- Forman B.M., Umesono K., Chen J. et Evans R.M., (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*. 81: 541-550.
- Franceschi S. et Bidoli E., (1999). The epidemiology of lung cancer. *Annals of Oncology*. 10 : S3-S6
- Fujino T., Yamazaki Y., Largaespada D.A., Jenkins N.A., Copeland N.G., Hirokawa K. et Nakamura T., (2001). Inhibition of myeloid differenciation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Experimental Hematology*. 29 : 856-863.
- Gazdar A.F. (1994). The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Research*. 13(1B) : 261-268.
- Gazdar A.F., Linnoila R.I., Kurita Y., Oie H.K., Mulshine J.L., Clark J.C. et Whitsett J.A., (1990). Peripheral airway celll differenciation in human lung cancer cell lines. *Cancer Research*. 50 : 5481-5487.
- Geradts J., Chen J.Y., Russel E.K., Yankaskas J.R., Nieves L. et Minna J.D., (1993). Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth and Differenciation*. 4 : 799-809.

Giguère A.F., (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins : complexe interplay in retinoid signaling. *Endocrine Reviews*. 15 : 61-78.

Giguère V., (1999). Orphan nuclear receptors : from gene to function. *Endocrine Reviews*. 20 : 689-725.

Giguère V., Ong E.S., Seigi P. et Evans R.M., (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*. 330 : 624-629.

Giguère V., Shago M., Zirngibl R., Tate P., Rossant J. et Varmuza S., (1990). Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor  $\gamma$  expressed in the mouse embryo. *Molecular and Cellular Biology*. 10 : 2335-2340.

Glass C.K., Lipkin S.M., Devary O.V. et Rosenfeld M.G., (1989). Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell*. 59: 697-708.

Gould A., Itasaki N. et Krumlauf R., (1998). Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoic pathway. *Neuron*. 21 : 39-51.

Gould A., Morrison A., Sproat G., White R. et Krumlauf R., (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing : two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes and Development*. 11 : 900-913.

Guazzi S., Lonigro R., Pintonello L., Boncinelli E., Di Lauro R. et Mavilio F., (1994). The thyroid transcription factor-1 gene is a candidate target for regulation by Hox proteins. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 13 : 3339-3347.

Guazzi S., Pintonello M.L., Viganò A. et Boncinelli E., (1998). Regulatory interactions between the human HOXB1, HOXB2, and HOXB3 proteins and the upstream sequence of the *Otx2* gene in embryonal carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 18 : 11092-11099

Haagsman H.P. et Diemel R.V., (2001). Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comparative Biochemistry & Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 129 : 91-108.

Hamada K., Gleason S.L., Levi B.-Z., Hirschfeld S., Apella E. et Ozato K., (1989). H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 : 8289-8293.

Hansen L.A., Sigman C.C., Andreola F., Ross S.A., Kelloff G.J. et De Luca L.M., (2000). Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis*. 21 : 1271-1279.



Hayashi K., Yokozaki H., Goodison S., Oue N., Suzuki T., Lotan R., Yasui W. et Tahara E., (2001). Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. *Differentiation*. 68 : 13-21.

Hayashi K., Yokozaki H., Naka K., Yasui W., Lotan R. et Tahara E., (2001). Overexpression of retinoic acid receptor beta induces growth arrest and apoptosis in oral cancer cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research*. 92 : 42-50.

Heinzel T., Lavinsky R.M., Mullen T-M., Soderstrom M., Laherty C.D., Torchia J., Yang W-M., Brard G., Ngo S.D., Davie J.R., Seto E., Eisenman R.N., Rose D.W., Glass C.K. et Rosenfeld M.G., (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 387 : 43-48.

Helgason C.D., Sauvageau G., Lawrence H.J., Largman C. et Humphries R.K., (1996). Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood*. 87 : 2740-2749.

Hertel C.B., Zhou X.G., Hamilton-Dutoit S.J. et Junker S., (2002). Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin Lymphoma. *Oncogene*. 21 : 4908-4920.

Honkakoski P., Zello I., Sueyoshi T. et Negishi M., (1998). The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Molecular and Cellular Biology*. 18 : 5652-5658.

Horlein A.J., Naar A.M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C.K. et Rosenfeld M.G., (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377 : 397-404.

Houle B., Rochette-Egly C. et Bradley W.E.C., (1993). Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor  $\beta$  in human epidermoid lung cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90 : 985-989.

Inoue K., Kawahito Y., Tsubouchi Y., Yamada R., Kohno M., Hosokawa Y., Katoh D., Bishop-Bailey D., Hla T., Sano H., (2001). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma in human lung cancer. *Anticancer Research*. 21: 2471-2476.

Institut national du cancer du Canada, (2001). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2001*. Toronto, Canada.

Ito T., Udaka N., Yazawa T., Okudela K., Hayashi H., Sudo T., Guillemot F., Kageyama R. et Kitamura H., (2000). Basic-loop-helix transcription factors regulate

the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development*. 127 : 3913-3921.

Izon D.J., Rozenfeld S., Fong S.T., Komuves L., Largman C. et Lawrence H.J., (1998). Loss of function of the homeobox Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood*. 92 : 383-393.

Jensen D.E., Proctor M., Marquis S.T., Gardner H.P., Ha S.I., Chodosh L.A., Ishov A.M., Tommerup N., Vissing H., Sekido Y., Minna J., Borodovsly A., Schultz D.C., Wilkinson K.D., Maul G.G., Barlev N., Berger S.L., Prendergast G.C. et Rauscher F.J. 3rd., (1998). BAP1: a novel ubiquitin hydrolase wich binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*. 16: 1097-1112.

Joel P.B., Smith J., Sturgill T.W., Blenis J. et Lannigan D.A., (1998). pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular and Cellular Biology*. 18 : 1978-1984.

Kang Y., Prentice M.A., Mariano J.M., Davarya S., Linnoila R.I., Moody T.W., Wakefield L.M. et Jalowlew S.B., (2000). Transforming growth factor-beta 1 and its receptors in human lung cancer and mouse lung carcinogenesis. *Experimental Lung Research*. 26 : 685-707.

Kappen C., (1996). Hox genes in the lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 15 : 156-162.

Kato S., Masuhiro Y., Watanabe M., Kobayashi Y., Takeyama K.I., Endoh H. et Yanagisawa J., (2000). Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*. 5 : 593-601.

Khuri F.R. et Lippman S.M., (2000). Lung cancer chemoprevention. *Seminars in Surgical Oncology*., 18 : 100-105.

Khuri F.R., Lotan R., Kemp B.L., Lippman S.M., Wu H., Feng L., Lee J.J., Cooksley C.S., Parr B., Chang E., Walsh G.L., Lee J.S., Hong W.K. et Xu X.C., (2000). Retinoic acid receptor-beta as a prognostic indicator in stage I non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 18 : 2798-2804.

Kim M.H., Chang H.H., Shin C., Cho M., Park D. et Park H.W., (1998). Genomuc structure and sequence analysis of human HOXA-9. *DNA and Cell Biology*. 17 : L407-L414.

Kleinerman R.A., Tarone R.E., Abramson D.H., Seddon J.M., Li F.P. et Tucker M.A., (2000)., Hereditary retinoblastoma and risk of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 : 2037-2039.

Klinge C.M., Jernigan S.C., Risinger K.E., Lee J.E., Tyulmenkov V.V., Falkner K.C. et Prough R.A., (2001). Short heterodimer partner (SHP) orphan nuclear receptor inhibits the transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 390 : 64-70.

Kok K., Van den Berg A., Veldhuis P.M., Franke M., Terpstra P. et Buys C.H., (1995). The genomic structure of the human UBE1L gene. *Gene Expression*. 4 : 163-175.

Komuves L.G., Shen W.F., Kwong A., Stelnicki E., Rozenfeld S., Oda Y., Blink A., Krishnan K., Lau B., Mauro T. et Largman C., (2000). Changes in HOXB6 homeodomain protein structure and localization during human epidermal development and differentiation. *Developmental Dynamics*. 218 : 636-647.

Kongsuwan K., Allen J. et Adams J.M., (1989). Expression of Hox-2.4 homeobox gene directed by proviral insertion in a myeloid leukemia. *Nucleic Acids Research*. 17 : 1881-1892.

Krosi J., Baban S., Krosi G., Rozenfeld S., Largman C., et Sauvageau G., (1998). Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene*. 16 : 3403-3412.

Krosi J. et Sauvageau G., (2000). AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. *Oncogene*. 19 : 5134-5141.

Krust A., Kastner P.H., Petkovich M., Zelent A. et Chambon P., (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR- $\gamma$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 : 5310-5314.

Kruyt F.A.E., Folkers G.E., Wilhout A.J.M., Van Der Ledge B.J.M. et Van Der Saag P.T., (1993). E1 a function as a cofactor retinoic acid-dependant retinoic acid receptor b2 promoter activation. *Molecular Endocrinology*. 7 : 604-615.

Kumar R.K., Li W. et O'Grady R., (1995). Maintenance of differentiated phenotype by mouse type 2 pneumocytes in serum-free primary culture. *Experimental Lung Research*. 21 : 79-94.

Kurokawa R., DiRenzo J., Boehm M., Sugarman J., Gloss B., Rosenfeld M., Heyman R.A. et Glass C.K., (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature*. 371 : 528-531.

Laffite B.A., Kast H.R., Nguyen C.M., Zavacki A.M., Moore D.D. et Edwards P.A., (2000). Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 : 10638-10647.

Langston A.W. et Gudas L.J., (1992). Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mechanisms of Development*. 38 : 217-227.

Langston A.W., Thompson J.R. et Gudas L.J., (1997). Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the Hox A and Hox B homeobox gene clusters. Functional analysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 : 2167-2175.

Lawrence H.J., Sauvageau G., Ahmadi N., Lopez A.R., LeBeau M.M., Link M., Humphries K. et Largman C., (1995). Stage- and lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Experimental Hematology*. 23 : 1160-1166.

Le Moigne A., (1997). Contrôle génétique du développement. Dans Le Moigne A. *Biologie du développement, 4ième édition 3ième partie, chapitre 1*. : 143-162, Masson.

Leclerc P., Jibard N., Meng X., Schweizer-Groyer G., Fortin D., Rajkowski K., Kang K., Catelli M.G., Baulieu E.E. et Cadepond F., (1998). Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein (Hsp90 alpha) and glucocorticosteroid receptor (GR). *Experimental Cell Research*. 242: 255-264.

Leenhouts H.P. et Brugmans M.J., (2001). Calculation of the 1995 lung cancer incidence in the Netherlands and Sweden caused by smoking and radon : risk implications for radon. *Radiation and Environmental Biophysics*. 40 : 11-21.

Lehmann J.M., Hoffmann B. et Pfahl M., (1991). Genomic organization of the retinoic acid receptor  $\gamma$  gene. *Nucleic Acids Research*. 19 : 573-578.

Leroy P., Krust A., Kastner P., Mandelsohn C., Zelent A. et Chambon P., (1992). Retinoic acid receptors. In : Morris-Kay G. (ed) *Retinoids in Normal Development and Teratogenesis*. pp 2-25, Oxford University Press, Oxford.

Leclerc P., Jibard N., Meng X., Schweizer-Groyer G., Fortin D., Rajkowski K., Kang K., Catelli M.G., Baulieu E.E. et Cadepond F., (1998). Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein (Hsp90 alpha) and glucocorticosteroid receptor (GR). *Experimental Cell Research*. 242 : 255-264.

Leid M., Kastner P., Lyons R., Nakshatri H., Saunders M., Zacharewski T., Chen J-Y., Staub A., Garnier J-M., Mader S. et Chanbon P., (1992). Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*. 68 : 377-395.

Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 276 : 565-570.

Li Y., Dawson M., Agadir A., Lee M.O. Jong L., Hobbs P.D. et Zhang X.K., (1998). Regulation of RAR beta expression by RAR- and RXR-selective retinoids in human lung cancer cell lines: effect on growth inhibition and apoptosis induction. *International Journal of Cancer*. 75 : 88-95.

Liaudet-Coopman E.D., Berchem G.J. et Wellstein A. (1997). In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 3 : 179-184.

Linnoila R.I., (1996). Spectrum of neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines featured by cytomorphology, markers, and their corresponding tumors. *Journal of Cellular Biochemistry*. Suppl. 24: 92-106.

Liu M., Iavarone A. et Freedman L.P., (1996). Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 : 31723-31728.

Lokshin A., Zhang H., Mayotte J., Lokshin M. et Levitt M.L., (1999). Early effects of retinoic acid on proliferation, differentiation and apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Research*. 19 (6B): 5251-5254.

Luo J., Pasceri P., Conlon R.A., Rossant J. et Giguère V., (1995). Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor  $\beta$  develop normally and are susceptible to the teratogenic effect of retinoid acid. *Mechanisms of Development*. 53 : 61-71.

Magli M.C., Barba P., Celetti A., De Vita G., Cillo C. et Boncinelli E., (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 : 6348-6352.

Mangelsdorf D.J., Borgmeyer U., Heyman R.A., Zhan J.Y., Ong E.S., Oro A.E., Kakizuka A. et Evans R.M., (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action 9-*cis*- RA retinoic acid. *Genes and Development*. 6 : 329-344.

Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A. et Evans R.M., (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 345 : 224-229.

Mao L., (2001). Molecular abnormalities in lung carcinogenesis and their potential clinical implications. *Lung Cancer*. 34 (suppl 2) : S27-S34.

Marieb E. N. (1993). Le système respiratoire. Dans Marieb E. N., *Anatomie et physiologie humaine*. Chapitre 23 : 724-764. ERPI, Saint-Laurent.

Maruyama R., Toyooka S., Toyooka K.O., Harada K., Virmani A.K., Zochbauer-Muller S., Farinas A.J., Vakar-Lopez F., Minna J.D., Sagalowsky A., Czerniak B. et Gazdar

- A.F., (2001). Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Research*. 61 : 8659-8663.
- Mason R.J., Kalina M., Nielsen L.D., Malkinson A.M. et Shannon J.M., (2000). Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors. *American Journal of Pathology*. 156 : 175-182.
- Massaro G.G., Massaro D., Chan W.Y., Clerch L.B., Ghyselinck N., Chambon P. et Chandraratna R.A., (2000). Retinoic acid receptor-beta : an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiological Genomics*. 4 : 51-57.
- Mattei M.G., de The H., Mattei J.F., Marchio A., Tiollais P., Dejean A. (1988). Assignment of the human Hap retinoic acid receptor RAR beta gene to the p24 band of chromosome 3. *Human Genetics*. 80 : 189-190.
- Mathew S., Murty V.V., Cheifetz S., George D., Massague J. et Chaganti R.S., (1994). Transforming growth factor receptor gene TGFBR2 maps to human chromosome band 3p22. *Genomics*. 20 : 114-115.
- Matthews M.J. et Linnoila E. I. (1988). Pathology of lung cancer – an update. Dans Bitran J. D., Golomb H. M., Little A. G. et Weichselbaum R. R. *Lung cancer: a comprehensive treatise*. Chapitre 2: 5-34. Grune & Stratton, New York.
- Maulbecker C.C. et Gruss P., (1993). The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth and Differentiation*., 4 : 431-441.
- McKenna N.J., Lanz R.B. et O'Malley B.W., (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews*. 20 : 321-344.
- Mendelsohn C., Mark M., Dollé P., Dierich A., Gaub M.P., Krust A., Lampron C. et Chambon P., (1994). Retinoic acid receptor  $\beta 2$  (RAR $\beta 2$ ) null mutant mice appear normal. *Developmental Biology*. 199: 246-258.
- Michigami T., Suga A., Yamazaki M., Shimizu C., Cai G., Okada S. et Ozono K., (1999). Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 : 33531-33538.
- Mikkola I., Bruun J.-A., Holm T. et Johansen T., (2001). Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by DNA-independent recruitment of different homeodomain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 : 4109-4118.
- Mina J.D., (1993). The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest*. 103 (4 suppl): 449S-456S.

Minucci S., Leid M., Toyama R., Saint Jeannet J-P., Peterson V.J., Ishmael J.E., Bhattacharyya N., Dey A., Dawid I.B. et Ozato K., (1997). Retinoid X receptor (RXR) within the RXE-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependant gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 17 : 644-655.

Morrison A., Moroni M.C., Ariza-McNaughton L., Krumlauf R. et Mavilio F., (1996). In vitro and transgenic analysis of a human HIOXD4 retinoic-responsive enhancer. *Development*. 122 : 1895-1907.

Nakajima M., Kawanami O., Jin E., Ghazizadeh M., Honda M., Asano G., Horida K. et Ferrans V.J., (1998). Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathology International*. 48 : 944-953.

Nagpal S., Friant S., Nakshatri H. et Chambon P., (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *The European Molecular Biology Organisation Journal*. 12 : 2349-2360.

Ogawa K., Pasqualini R., Lindberg R.A., Kain R., Freeman A.L. et Pasquale E.B., (2000). The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene*. 19: 6043-6052.

Ogryzko V.V., Schiltz R.L., Russanova V., Howard B.H. et Nakatani Y., (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 87 : 953-959.

Ogura T., et Evans R.M., (1995). Evidence for two distinct retinoic acid response pathways for HOXB1 gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 : 392-396.

Oikawa T., Hirotsu K., Nakamura O., Shudo K., Hiragun A. et Iwaguchi T., (1989). A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Letters*. 48 : 157-162.

Packer A.I., Crotty D.A., Elwell V.A. et Wolgemuth D.J., (1998). Expression of the murine Hoxa4 gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development*. 125 : 1991-1998.

Paggi M.G., Baldi A., Bonetto F. et Giordano A., (1996). Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer : a review. *The Journal of Cellular Biochemistry*. 62 : 418-430.

Pascussi J.M., Jounaidi Y., Drocourt L., Domergue J., Baladaud C., Maurel P. et Vilarem M.J., (1999). Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A6 promoter gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*., 260 : 377-381.

Pata I., Studer M., van Doorninck J.H., Briscoe J., Kuuse S., Engel J.D., Grosveld F. et Karis A., (1999). The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development*. 126: 5523-5531.

Perkins A.C. et Cory S., (1993). Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 12 : 3835-3846.

Perkins A., Kongsuwan K., Visvader J., Adams J.M. et Cory S., (1990). Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87 : 8398-8402.

Perlmann T. et Jansson L., (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes and Development*. 9 : 377-381.

Petkovich M., Brand N.J., Krust A. et Chambon P., (1987). Human retinoic acid receptor belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*. 330 : 444-450.

Picard D. et Yamamoto K.R., (1987). Two signals mediate hormone-dependant nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 6 : 3333-3340.

Piedrafita F.J. et Pfahl M. (1999). Nuclear retinoid receptor and mechanism of action. Dans Nau H. et Blaner W.S., *Retinoids: the biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action*. Handbook of experimental pharmacology vol.139. Chapitre 5: 154-184. Springer, Heidelberg.

Pili R., Kruszewski M.P., Hager B.W., Lantz J. et Carducci M.A., (2001). Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. *Cancer Research*. 61 : 1477-1485.

Pitterle D.M., Jolicoeur E.M. et Bepler G., (1998). Hot spots for molecular genetic alterations in lung cancer. *In Vivo*. 12: 643-658.

Pfützner E., Kirfel J., Becker P., Rolke A. et Schüle R., (1998). Physical interaction between Retinoic Acid Receptor and oncoprotein Myb inhibits retinoic acid-dependant transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 : 5539-5544.

Phelps D.S. et Floros J., (1991). Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization. *Experimental Lung Research*. 17: 985-995.



Popperl H., Bienz M., Studer M., Chan S.K., Aparicio S., Brenner S., Mann R.S. et Krumlauf R., (1995). Segmental expression of *Hoxb-1* is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon *exd/pbx*. *Cell*. 81 : 1031-1042.

Popperl H. et Featherstone M.S., (1993). Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine *Hox-4.2* gene. *Molecular and Cellular Biology*. 13 : 257-265.

Qiu H., Zhang W., El-Naggar A.K., Lippman S.M., Lin P., Lotan R. et Zu X.C., (1999). Loss of retinoic acid receptor-beta expression is an early event during esophageal carcinogenesis. *American Journal of Pathology*. 155 : 1519-1523.

Raman V., Martensen S.A., Reisman D., Evron E., Odenwald W.F., Jaffee E., Marks J. et Sukumar S., (2000). Compromised *HOXA5* function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*. 405 : 974-978.

Raz Y. et Kelley M.W., (1997). Effects of retinoid and thyroid receptors during development of the inner ear. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 8 : 257-264.

Ribeiro R.C., Feng W., Wagner R.L., Costa C.H., Pereira A.C., Apriletti J.W., Flatterick R.J. et Baxter J.D., (2001). Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoic X receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 : 14987-14995.

Rodriguez-Puebla M.L., Robles A.I. et Conti C.J., (1999). ras activity and cyclin D1 expression: an essential mechanism of mouse skin tumor development. *Molecular Carcinogenesis*. 24: 1-6.

Rogatsky I., Trowbridge J.M. et Garabedian M.J., (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *The Journal of Biological Chemistry*., 274 : 22296-22302.

Rogers M.B., (1997). Life-and-death decisions influenced by retinoids. *Current Topics in developmental biology*. 35 : 1-46.

Rosen O., Geffen R., Avivi C. et Goldstein R.S., (1996). Growth, proliferation, and cell death in the ontogeny of transient DRG (Frobiep's ganglia) of chick embryos. *Journal of Neurobiology*. 30 : 219-230.

Salgia R. et Skarin A.T., (1998). Molecular abnormalities in lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 16 : 1207-1217.

Schrader M., Bendik I., Becker-Andre M. et Carlberg C., (1993). Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 268 : 17830-17836.

Selleri L., Depew M.J., Jacobs Y., Chanda S.K., Tsang K.Y., Cheah K.S., Rubenstein J.L., O'Gorman S. et Cleary M.L., (2001). Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 128 : 3543-3557.

Shi X., Bai S., Li L. et Cao X., (2001). Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 27 : 850-855.

Sladek R. et Giguère V., (2000). Orphan nuclear receptors: an emerging family of metabolic regulators. *Advances in Pharmacology*. 47 : 23-87.

Sommer K.M., Chen L.I., Treuting P.M., Smith L.T. et Swisshelm K., (1999). Elevated retinoic acid receptor beta(4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 : 8651-8656.

Soncin F., Fafeur V. et Vandebunder B., (1999). Transcription factors and angiogenesis. *Pathologie et Biologie*. 47 : 358-363.

Song M.R., Lee S.K., Seo Y.W., Lee J.W. et Lee M.O., (1998). Differential modulation of transcriptional activity of oestrogen receptors by direct protein-protein interactions with retinoid receptors, *Biochemical Journal*. 336 : 711-717.

Stremmel C., Wein A., Hohenberger W. et Reingruber B., (2002). DNA microarrays : a new diagnostic tool and its implication in colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*. 17 : 131-136.

Takimoto G.S., Hovland A.R., Tasset D.M., Melville M.Y., Tung L. et Horwitz K.B., (1996). Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 : 13308-13316.

Thaete L.G. et Malkinson A.M., (1991). Cells of origin of primary pulmonary neoplasms in mice: morphologic and histochemical studies. *Experimental Lung Research*. 17 : 219-228.

Thorsteinsdottir U., Kroon E., Jerome L., Blasi F. et Sauvageau G., (2001). Defining roles for *Hox* and *Meis1* genes in induction of acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology*. 21 : 224-234.

Thorsteinsdottir U., Sauvageau G., Hough M.R., Dragowska W., Lansdorp P.M., Lawrence H.J., Largman C. et Humpries R.K., (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology*. 17 : 495-505.

Tiberio C., Barba O., Magli M.C., Arvelo F., Le Chevalier T., Poupon M.F. et Cillo C., (1994). Hox gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *International Journal of Cancer*. 58 : 608-615.

Toma S., Raffo P., Isnardi L. et Palumbo R., (1999). Retinoids in lung cancer chemoprevention and treatment. *Annals of Oncology*. 10 suppl 5: S95-S102.

Tomotsune D., Shoji H., Wakamatsu Y., Kondoh H. et Takahashi N., (1993). A mouse homologue of the *Drosophila* tumor-suppressor gene 1(2)gl controlled by Hox-C8 in vivo. *Nature*. 365: 98-72.

Tran P., Zhang X-K., Salbert G., Hermann T. et Pfahl M., (1992). COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Molecular and Cellular Biology*. 12 : 4666-4676.

Tsai F.-Y. et Orkin S.H., (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 89 : 3636-3643.

Tsubouchi Y., Sano H., Kawahito Y., Mukai S., Yamada R., Kohno M., Inoue K., Hla T. et Kondo M., (2000). Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 270 : 400-405.

Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S. et Possmayer F., (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1408 (2-3) : 90-108.

Vider B-V., Zimmer A., Chastre E., Gespach C., Halperin M., Mashiah P., Yaniv A. et Gazit A., (2000). Deregulated expression of homeobox-containing genes HoxB6, B8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 272 : 513-518.

Vinogradov A.E., (1995). Cell membrane-dependent chromatin condensation. *Cytometry*. 19 : 183-188.

Virmani A.K., Rathi A., Zochbauer-Muller S., Sacchi N., Fukuyama Y., Bryant D., Maitra A., Heda S., Fong K.M., Thunnissen F., Minna J.D. et Gazdar A.F., (2000). Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 : 1303-1307.

Vlakavis N., Choe S.K. et Sagerstrom C.G., (2001). Meis3 synergizes with Pbx4 and Hoxb1b in promoting hindbrain fates in the zebrafish. *Development*. 128 : 1299-1312.

Vogel S., Gamble M.V. et Blaner W.S., (1999). Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids, Dans Nau H. et Blaner W.S. *Retinoids: the biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action*. Handbook of experimental pharmacology vol.139. Chapitre 2, pp 31-95.

Wang C., Fu M., Angeletti R.H., Siconolfi-Baez L., Reutens A.T., Albanese C., Lisanti M.P., Katzenellenbogen B.S., Kato S., Hopp T., Fuqua S.A., Kushner P.J. et Pestell R.G., (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 : 18375-18383.

Wang X.D., Liu C., Bronson R.T., Smith D.E., Krinsky N.I. et Russel M., (1999). Retinoid signalling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *Journal of National Cancer Institute*. 91: 60-66.

Wang Z., Sicinski P., Weinberg R.A., Zhang Y. et Ravid K., (1996). Characterization of the mouse cyclin D3 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics*. 35: 156-163.

Widschwendter M., Berger J., Daxenbichler G., Muller-Holzner E., Widschwendter A., Mayr A., Marth C. et Zeimet A.G., (1997). Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Research*. 57 : 4158-4161.

Widschwendter M., Berger J., Muller H.M., Zeimet A.G. et Marth C., (2001). Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia*. 6 : 193-201.

Willy P.J., Umesono K., Ong E.S., Evans R.M., Heyman R.A. et Mangelsdorf D.J., (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes and Development*. 9 : 1033-1045.

Whitsett J.A. et Glasser S.W., (1998). Regulation of surfactant protein gene transcription. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1408 : 303-311.

Wu Q., Chen Z. et Su W., (2001). Growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid through arresting cell cycle progression. *Chinese Medical Journal*. 114 : 958-961.

Xiao J.H., Durand B., Chambon P. et Voorhees J.J., (1995). Endogenous retinoic acid receptor (RAR)-retinoic X receptor (RXR) heterodimers are the major functional forms regulating retinoic-responsive elements in adult human keratinocytes. Binding of

ligands to RAR only is sufficient for RAR-RXR heterodimers to confer ligand-dependent activation of hRAR beta 2/RARE (DR5). *The Journal of Biological Chemistry*. 270 : 3001-3011.

Xinarianos G., Liloglou T., Prime W., Maloney P., Callaghan J., Fielding P., Gosney J.R. et Field J.K., (2000). hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research*. 60 : 4216-4221.

Yang X.J., Ogryzko V.V., Nishikawa J. et Howard B.H., (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1a. *Nature*. 382 : 319-324.

Yu V.C., Delsert C., Andersen B., Holloway J.M., Devary O.V., Naar A.M., Kim S.Y., Boutin J.-M., Glass C.K. et Rosenfeld M.G., (1991). RXR $\beta$ : a co-regulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*. 67 : 1251-1266.

Zeng Q., Smith D.C., Suscovich T.J., Gooding W.E., Trump D.L. et Grandis J.R., (2000). Determination of intermediate biomarker expression levels by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in oral mucosa of cancer patients treated with liarozole. *Clinical Cancer Research*. 6 : 2245-2251.

Zhang X.K., Lehmann J., Hoffmann B., Dawson M.I., Cameron J., Graupner G., Hermann T et Pfahl M., (1992). Homodimer formation of retinoic X receptor induced by 9-*cis*-retinoic acid. *Nature*. 358 : 587-591.

Zhou G., Strom R.C., Giguere V., Williams R.W., (2001). Modulation of retinal cell populations and eye size in retinoic acid receptor knockout mice. *Molecular Vision*. 7 : 253-260.