

Université de Sherbrooke

**Caractérisation des mécanismes moléculaires liés à p53 régulant l'expression du gène
P2RY6.**

Par
Caroline Molle
Programme de Biologie Cellulaire

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

Sherbrooke, Québec, Canada
15 septembre 2016

Membres du jury d'évaluation
Professeur Fernand-Pierre Gendron, département d'Anatomie et Biologie Cellulaire.
Professeur Pierre H. Vachon, département d'anatomie et Biologie Cellulaire.
Professeur Guylain Boissonneault, département de Biochimie.

© Caroline Molle, 2016

RÉSUMÉ

Caractérisation des mécanismes moléculaires liés à p53 régulant l'expression du gène *P2RY6*.

Par
Caroline Molle
Programme de Biologie Cellulaire.

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le récepteur P2Y₆ est un récepteur couplé à une protéine G responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation. Dans l'épithélium du côlon, il participe au maintien de l'équilibre hydrique, mais il a été montré que le récepteur P2Y₆ participait à l'aggravation des symptômes inflammatoires dans la maladie de Crohn ou dans la colite ulcéreuse. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des facteurs pouvant mener au cancer colorectal. En effet, il existe deux types de cancers colorectaux : le cancer sporadique et le cancer associé à la colite qui se différencient notamment par la séquence d'apparition de mutations génétiques. Par exemple, le gène *TP53* est muté de façon tardive dans le cancer colorectal sporadique et muté de façon précoce dans le cancer associé à l'inflammation. Puisque le récepteur P2Y₆ est impliqué dans la création d'un environnement pro-inflammatoire, nous nous sommes intéressés au rôle de p53 sur l'expression du gène *P2RY6* et avons formulé l'hypothèse suivante : **la présence de TP53 mutant va réguler de façon différentielle l'expression du gène *P2RY6* dans le cancer colorectal.** L'objectif général des travaux est le suivant : caractériser les mécanismes moléculaires liés à *TP53* régulant l'expression du gène *P2RY6* dans le cancer colorectal. Les objectifs spécifiques pour ce projet de recherche sont donc : (1) déterminer et caractériser les régions promotrices du gène *P2RY6* dans les cellules épithéliales intestinales cancéreuses et (2) étudier l'effet de la protéine p53 de type sauvage ou mutée sur l'expression du récepteur P2Y₆. Le gène *P2RY6* code pour 8 variants d'ARN messagers. Les variants 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8 codent pour l'isoforme 1 du récepteur P2Y₆, forme connue du récepteur. Le variant 9 code pour l'isoforme 2, non caractérisée. Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'existence de quatre régions promotrices potentielles du gène *P2RY6* et la présence du variant 9, codant pour l'isoforme 2 du récepteur P2Y₆ dans la lignée cellulaire Caco-2. Nous avons également montré que les formes normale et mutée de p53 régulent de façon différentielle l'expression du récepteur P2Y₆. Enfin, le rôle de l'isoforme 2 reste à étudier, mais les tests effectués suggèrent qu'elle est activable par l'UDP.

Mots clés : [Récepteur purinergique, récepteur P2Y₆, transcription, p53, mutation]

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
INTRODUCTION	1
Le système digestif	1
Le côlon.....	2
Structure macroscopique	2
Structure microscopique	3
Le cancer colorectal	5
Les récepteurs nucléotidiques.....	7
Les nucléotides.....	7
Les récepteurs P1.....	9
Les récepteurs P2.....	9
Les récepteurs P2X.....	10
Les récepteurs P2Y.....	10
Le récepteur P2Y ₆	11
P53.....	16
La transcription	20
L'ARN polymérase et les facteurs de transcription	20
L'épigénétique	22
L'épissage alternatif.....	25
MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
Culture cellulaire	28
Cellules Caco-2	28
Cellules HCT 116	28
Cellules HT-29	29
Cellules HEK-293.....	29
Détermination des sites d'initiation de la transcription par 5'-RACE	30

Détermination du profil d'expression des variants d'ARNm de <i>P2RY6</i> dans des lignées cellulaires épithéliales intestinales cancéreuses.....	33
Clonage des quatre régions promotrices potentielles de <i>P2RY6</i>	34
Essais luciférase	37
Immunobuvardage de type Western.	37
Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).	38
Essais AlphaScreen SureFire.....	39
RÉSULTATS.....	41
Déterminer et caractériser les régions promotrices du gène <i>P2RY6</i> dans les cellules épithéliales intestinales cancéreuses.....	41
Étudier l'effet de p53 (mutante versus forme sauvage) sur l'expression du récepteur <i>P2Y₆</i>	53
DISCUSSION	61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	77
Liste des références.....	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le système digestif humain.	1
Figure 2 : Composition anatomique du côlon humain.	2
Figure 3 : Représentation de la structure microscopique de l'épithélium colique	4
Figure 4 : Voie canonique de la signalisation Wnt/ β -caténine.....	5
Figure 5 : Les différents stades de développement du cancer colorectal selon de le type de cancer et la séquence chronologique des mutations associée.....	7
Figure 6 : Imagerie de souris nues porteuses de tumeurs ovariennes, dans lesquelles ont été injectées des cellules HEK-293-pmeLUC, senseurs de l'ATP..	8
Figure 7 : Les différents récepteurs nucléotidiques et nucléosidiques activés par les nucléotides extracellulaires..	9
Figure 8 : Voie de signalisation déclenchée par l'UDP.....	12
Figure 9 : Analyses de PCR quantitative présentant la quantité de transcrits du gène <i>P2RY6</i> dans différents tissus.....	13
Figure 10 : Réponses contractiles induites par ATP, ADP, UTP et UDP d'un segment d'aorte de souris de type sauvage ou invalidées pour <i>P2Y6</i>	14
Figure 11 : Le récepteur <i>P2Y6</i> participe au transport ionique dans la muqueuse colorectale de rat, placée en chambre Ussing.....	14
Figure 12 : Score histologique de souris traitées au DSS ou au PBS (souris contrôles) pendant neuf semaines.....	15
Figure 13 : L'inflammation intestinale provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur <i>P2Y6</i>	16
Figure 14 : Les différents domaines fonctionnels de la protéine p53 et la fréquence des mutations associées.	18
Figure 15 : Différents mécanismes d'action des mutant gain-de-fonction de p53.....	19
Figure 16 : La transcription est médiée par l'ARN polymérase II.	21
Figure 17 : Représentation des principales modifications post-traductionnelles subies par les histones et de la méthylation de l'ADN ainsi que les enzymes catalysant les différentes réactions.....	23

Figure 18 : Le mutant p53R273H cible directement des régulateurs de la chromatine.	24
Figure 19 : Représentation des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes ou protéines	25
Figure 20 : Représentation de la synthèse d'un brin d'ARN et son épissage alternatif menant à trois protéines différentes.....	26
Figure 21 : Récapitulatif du protocole de l'expérience 5'RACE.....	32
Figure 22 : Validation des produits de PCR lors de l'expérience 5'RACE.....	42
Figure 23 : Détermination des sites d'initiation de la transcription des variants d'ARNm V5 et V9 de <i>P2RY6</i> suite à l'expérience de 5'RACE.	44
Figure 24 : Quantification des variants 1 (V1), 3 (V3), 6 (V6), 7 (V7), 2 (V2), 5 (V5) et 9 (V9) d'ARNm de <i>P2RY6</i> , correspondant aux quatre régions promotrices potentielles (R1, R2, R3 et R4) dans les cellules A) HCT 116 ; B) HT-29 et C) Caco-2.	46
Figure 25 : Activité transcriptionnelle des quatre régions d'activation potentielle du gène humain <i>P2RY6</i>	48
Figure 26 : L'activité transcriptionnelle des régions 1 et 4 augmente lorsque l'on augmente la quantité de <i>TP53^{WT}</i> ou <i>TP53^{R273H}</i>	49
Figure 27 : Activité transcriptionnelle des régions 1 et 4 du promoteur de <i>P2RY6</i> en réponse à l'expression de p53 normale ou de sa forme mutante p53 ^{R273H}	51
Figure 28 : Niveaux d'expression des protéines p53 exogènes dans des cellules HCT116 transfectées.....	52
Figure 29 : Compétition des formes p53 ^{WT} et p53 ^{R273H} pour se lier au promoteur de <i>P2RY6</i>	54
Figure 30 : Les ChIP permettent d'identifier les facteurs de transcription liés à une région d'ADN précise	56
Figure 31 : La présence du mutant <i>TP53^{R273H}</i> induit une augmentation de l'expression des facteurs de transcription c-Fos et c-Myc ce qui pourrait contribuer à la régulation de l'expression de P2Y ₆	58
Figure 32 : La phosphorylation de ERK et CREB traduit l'activation de voies de signalisation suite à la liaison de l'UDP sur le récepteur P2Y ₆	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Lignées cellulaires cancéreuses colorectales utilisées et leur origine.....	30
Tableau 2 : Lignées cellulaires cancéreuses colorectales utilisées et leurs mutations dans les principaux oncogènes retrouvés dans le cancer colorectal.....	30
Tableau 3 : Variants d'ARNm V5 et V9 de <i>P2RY6</i> étudiés dans l'expérience de 5'RACE, associés à la région promotrice 4 et leur taille.....	33
Tableau 4 : Stratégies de clonage des différentes constructions obtenues à partir de la région 1 du promoteur de <i>P2RY6</i>, dans le vecteur pGL4.10[<i>luc2</i>].....	35
Tableau 5 : Stratégies de clonage des différentes constructions obtenues à partir de la région 4 du promoteur de <i>P2RY6</i>, dans le vecteur pGL4.10[<i>luc2</i>].....	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5'/3'RACE	<i>Rapid Amplification of 5' or 3' cDNA Ends</i>
5'UTR	<i>5' Untranslated Region</i>
µg	µgrammes
µL	µLitres
A	Adénine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine Diphosphate
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPC	Adénosine Monophosphate cyclique
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APC ^{Min}	<i>APC^{Multiple intestinal neoplasia}</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
dATP	Désoxyadénosine Triphosphate
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
cdk1	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
C	Cytosine
CD73	<i>Cluster of Differentiation 73</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CK1	Caséine Kinase 1
cm	centimètres
CNG	<i>Cyclic Nucleotide-Gated channels</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
D	Acide aspartique
DAG	Diacylglycérol

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNMT	<i>DNA Methyltransferase</i>
DSS	<i>Dextran Sodium Sulfate</i>
E	Acide glutamique
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EPAC	<i>Exchange Protein directly Activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
Ets-1	<i>E26 transformation-specific 1</i>
FOXP2	<i>Forkhead box P2</i>
G	Glycine
G	Guanine
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate Deshydrogenase</i>
GSK3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
H	Histidine
HAT	<i>Histone Acetyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i>
HDM	<i>Histone Demethylase</i>
HMT	<i>Histone Methyltransferase</i>
IGF2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
IgG	Immunoglobuline G
IP	Immunoprécipitation
IP3	Inositoltriphosphate
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma virus</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor</i>
MAR	<i>Matrix Attachment Regions</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
mg	milligrammes
mL	millilitres
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NF-Y	<i>Nuclear Factor Y</i>
ng	nanogrammes
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
P	Proline
pb	paires de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR quantitative
pH	Potentiel Hydrogène
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit</i>
<i>Alpha</i>	
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
R	Arginine
RCPG	Récepteur Couplé à une Protéine G
S	Sérine
SWI/SNF	<i>Switch/Sucrose Non-Fermentable</i>
T	Thréonine
T	Thymine
TopBP1	<i>Topoisomerase II β Binding Protein</i>
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>
UDP	Uracile Diphosphate
UTP	Uracile Triphosphate
V	Valine
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>
W	Tryptophane
WT	<i>Wild Type</i>

INTRODUCTION

Le système digestif

Le tractus digestif (Figure 1) s'étend de la bouche à l'anus et comprend la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin. Ce dernier est composé du caecum, du côlon, du rectum et du canal anal (Drake *et al.* 2010). Chaque organe remplit une fonction particulière. La bouche sert à la séparation mécanique de la nourriture et à l'initiation de la digestion via la salive sécrétée par les glandes salivaires. Le pharynx est l'organe de déglutition et l'œsophage conduit les aliments jusqu'à l'estomac où la digestion se poursuit grâce à un pH acide et aux sucs digestifs sécrétés. Les nutriments issus de la nourriture sont absorbés au niveau de l'intestin grêle. Le bol alimentaire, ou chyme se déverse ensuite dans le caecum. Enfin, l'eau résiduelle est absorbée au niveau du côlon afin de constituer la matière fécale qui passera par le rectum et le canal anal pour être expulsée (Seidel 2006).

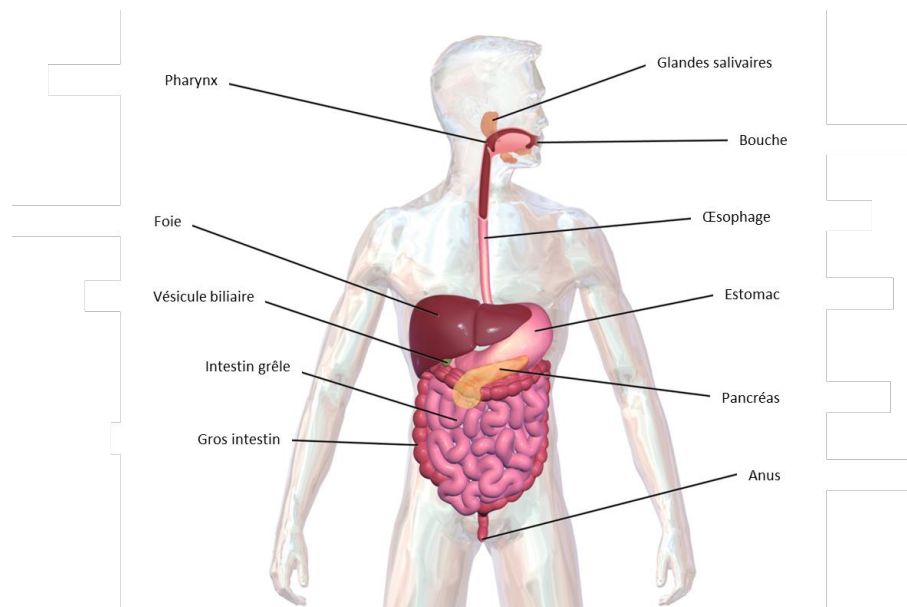


Figure 1 : Le système digestif humain (adapté de Blausen 2014).

Le côlon

Avant que le chyme n'atteigne le côlon, presque tous les nutriments et environ 90 % de l'eau auront déjà été absorbés par l'organisme. Le côlon absorbe l'eau résiduelle et le reste des éléments nutritifs. L'échange d'ions est donc très important au niveau du côlon, car l'équilibre hydrique doit y être maintenu (Seidel 2006).

Structure macroscopique

Le côlon est la plus longue partie du gros intestin et est divisé en 4 parties (Figure 2) :

- le côlon ascendant se trouve du côté droit de l'abdomen et monte jusqu'à une courbure appelée angle droit du côlon ;
- le côlon transverse traverse la partie supérieure de l'abdomen et se termine par l'angle gauche du côlon ;
- le côlon descendant se trouve du côté gauche de l'abdomen ;
- enfin, le côlon sigmoïde est la dernière partie du côlon reliée au rectum.

Il est composé de plusieurs couches concentriques : une muqueuse, une sous-muqueuse, une couche musculaire lisse longitudinale et le péritoine, membrane séreuse tapissant l'abdomen (Drake *et al.* 2010).

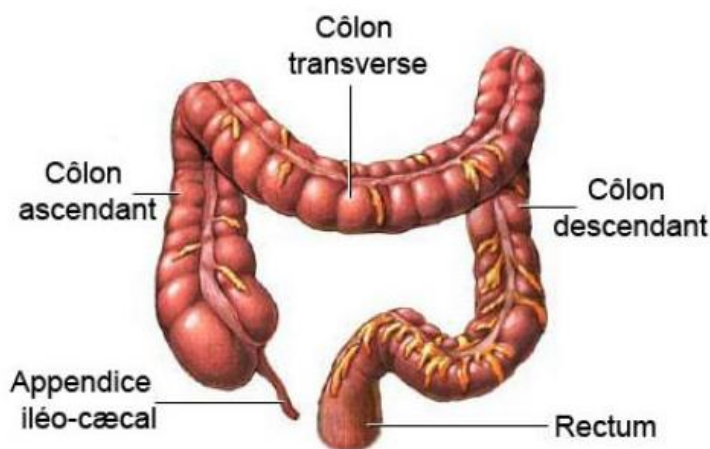


Figure 2 : Composition anatomique du côlon humain (www.health.allrefer.com).

Le chyme se mélange au mucus et aux bactéries formant la microflore et devient alors la matière fécale. Les bactéries cassent certaines fibres pour se nourrir, produisant ainsi des déchets, qui sont à leur tour utilisés comme nutriments par les cellules du côlon. C'est un exemple de relation symbiotique qui fournit une centaine de calories par jour à l'organisme (Hooper & Gordon 2001).

Structure microscopique

Le côlon est formé par un épithélium simple qui repose sur le mésenchyme (Figure 3). Contrairement aux cellules épithéliales intestinales qui sont organisées selon un axe cryptes-villosités, l'épithélium du côlon est uniquement composé de cryptes, appelées les cryptes de Lieberkühn (Seidel 2006). Au fond des cryptes, nous retrouvons les cellules pluripotentes à l'origine des cellules progénitrices du tiers inférieur des cryptes. Ces dernières vont migrer progressivement vers la lumière tout en se différenciant (van de Wetering *et al.* 2002). Ainsi, à la surface de l'épithélium se trouvent les différents types de cellules différenciées : les cellules absorbantes (les colonocytes) et les cellules sécrétoires qui regroupent les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus ainsi que les cellules entéroendocrines responsables de la sécrétion d'hormones régulatrices des fonctions digestives (Sarmiento 2015). Étant en contact avec le milieu extérieur, l'épithélium joue un rôle de barrière protectrice physique. La barrière physique est assurée par la structure elle-même de l'épithélium, les cellules étant reliées entre elles par des jonctions serrées et par le mucus qui forme une couche protectrice sur l'épithélium. Tel que mentionné précédemment, les cellules caliciformes sécrètent des mucines (la mucine 2 est la plus abondante) qui sont les principales composantes du mucus (Kim & Ho 2010). Contrairement à l'épithélium intestinal, celui du côlon ne comprend pas de cellules de Paneth, en conditions normales.

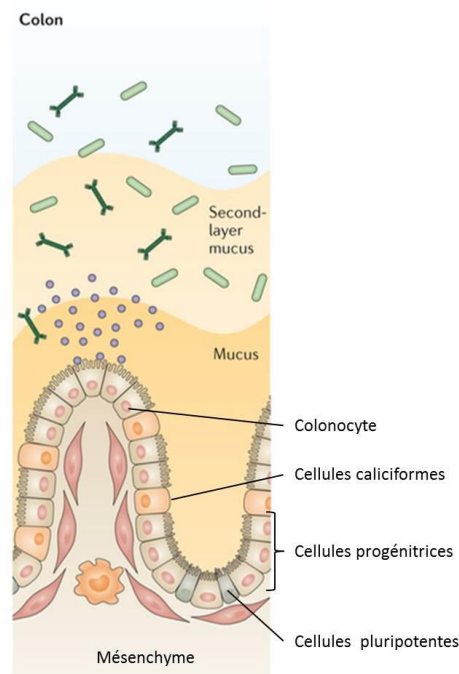


Figure 3 : Représentation de la structure microscopique de l'épithélium colique, montrant les différents types de cellules différenciées, les cellules associées à l'épithélium et les sécrétions des cellules épithéliales. Les cellules pluripotentes à l'origine des cellules progénitrices qui migrent progressivement en se différenciant pour donner les cellules absorbantes (les colonocytes) et les cellules sécrétrices (cellules caliciformes et cellules entéroendocrines) (adapté de Peterson & Artis 2014).

La différenciation des cellules des cryptes coloniques est finement régulée par plusieurs voies de signalisation. La voie des BMP inhibe l'activation des cellules souches et promeut la différenciation (He *et al.* 2005) et la voie Notch est impliquée dans la différenciation des cellules sécrétrices spécifiquement (van Es & Clevers 2005). La voie canonique Wnt- β -caténine (Figure 4), quant à elle, est responsable du maintien des cellules souches et de la prolifération des cellules progénitrices (Clevers 2006). Ces trois voies de signalisation assurent le renouvellement normal de l'épithélium, en 3 à 5 jours (Potten & Loeffler 1990). Dans l'intestin grêle, les cellules de Paneth sont les principales sources de protéines Wnt, mais, comme mentionné précédemment, elles sont absentes de l'épithélium du côlon. Elles peuvent alors être sécrétées par les colonocytes, les cellules entéroendocrines et les cellules du mésenchyme (Gregorieff *et al.* 2005). En absence de protéines Wnt, la β -caténine est phosphorylée par la CK1 et la GSK3 β , toutes deux des sérines/thréonines kinases. Leur interaction est facilitée par deux protéines d'échafaudage :

l'axine et APC. La β -caténine est ensuite ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome. Ainsi, la CK1, GSK3 β , l'axine et APC font partie du complexe de dégradation de la β -caténine. Lorsqu'une protéine Wnt se lie au domaine riche en cystéines d'un récepteur Frizzled, la β -caténine n'est plus phosphorylée, s'accumule dans le cytoplasme et transloque au noyau. Son association à des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF entraîne la transcription des gènes cibles. En temps normal, les facteurs de transcription TCF/LEF agissent comme répresseur de la transcription, mais deviennent activateurs quand ils s'associent à la β -caténine (Nusse 2005).

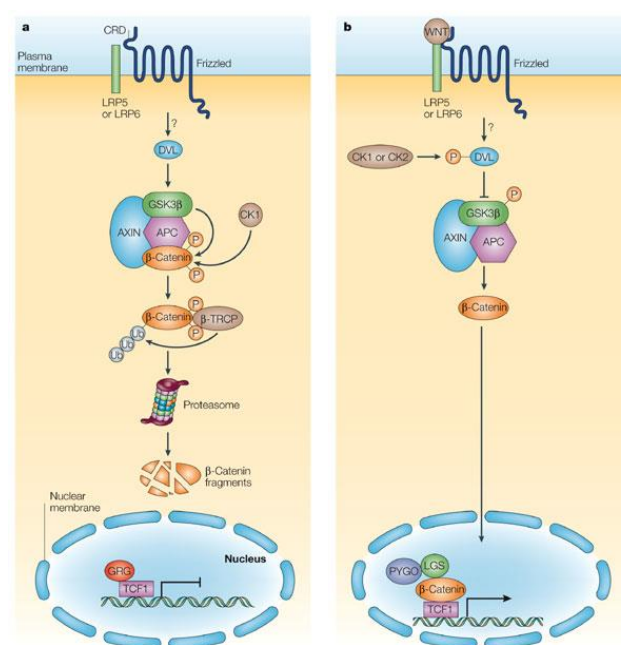


Figure 4 : Voie canonique de la signalisation Wnt/ β -caténine. a) Lorsque la voie n'est pas activée, la β -caténine est phosphorylée par les kinases CK1 et GSK3 afin d'être ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. b) Lorsque la voie est activée par la fixation d'une protéine Wnt sur un récepteur Frizzled, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis transloque au noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF et entraîne la transcription des gènes cibles (adapté de Staal & Clevers 2005).

Une suractivation de cette voie entraîne une hyperprolifération des cellules et peut mener au cancer colorectal.

Le cancer colorectal

Selon la société canadienne du cancer, le cancer colorectal est la deuxième cause de mortalité liée au cancer chez les hommes et troisième chez les femmes. Il existe 2 types de cancer colorectal : le cancer sporadique et le cancer associé à la colite (Figure 5). Dans ce dernier cas, des symptômes inflammatoires chroniques et sévères comme ceux de la colite ulcéreuse peuvent conduire à la tumorigenèse colorectale. Dans les deux cas, le cancer est dû à des mutations génétiques et des dérégulations épigénétiques, telles que la méthylation aberrante du promoteur de *TP53* (Chmelarova *et al.* 2013). Les mutations les plus fréquentes se retrouvent dans les gènes *APC*, *KRAS* et *TP53*. Comme décrit précédemment, la protéine APC fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine. Les mutations dans le gène *APC* entraînent la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle. La β -caténine n'est alors plus dégradée et la voie Wnt- β -caténine est constitutivement active, menant à une prolifération cellulaire anormale et à la formation de polypes, comme c'est le cas dans la polypose adénomateuse familiale (Voloshanenko *et al.* 2013). Pour cette raison, les modèles murins *APC^{min}*, qui développent spontanément de nombreux polypes, sont utilisés afin d'étudier les maladies inflammatoires de l'intestin ou le cancer colorectal. A noter qu'il s'agit de modèles hétérozygotes, car la double mutation d'*APC* est non viable (Ishikawa *et al.* 2003). Ensuite, la protéine KRAS est une GTPase responsable de transmettre les signaux de certains facteurs de croissance comme ceux induits par l'EGF. Dans le cancer colorectal, la protéine mutée est constitutivement active entraînant une croissance cellulaire anormale. Enfin, la protéine p53 est un suppresseur bien connu provoquant l'arrêt du cycle cellulaire en cas de dommages à l'ADN par exemple. Ainsi, une mutation dans *TP53* entraîne également une prolifération anormale des cellules. Selon le type de cancer, la séquence d'apparition des mutations est différente.

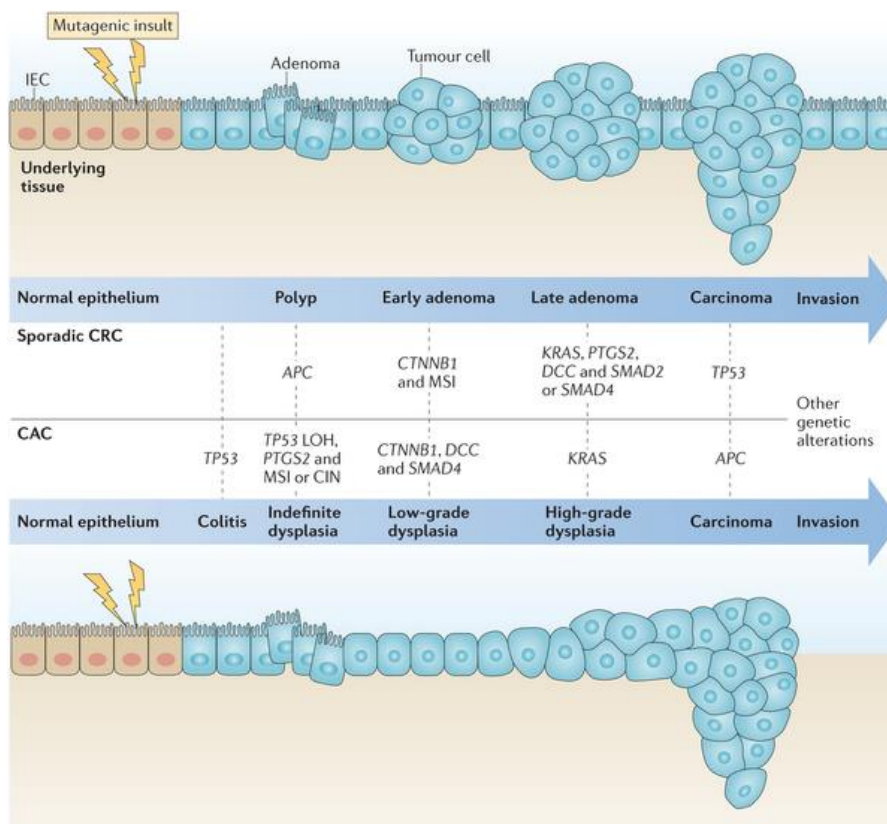


Figure 5 : Les différents stades de développement du cancer colorectal selon de le type de cancer et la séquence chronologique des mutations associée (adapté de West *et al.* 2015).

Les récepteurs nucléotidiques

Les nucléotides

Un nucléotide est formé d'une base (adénine, guanine, cytosine, thymine ou uracile), d'un ose et d'un ou plusieurs phosphates. Connus pour composer l'ADN et l'ARN, ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques tels que la glycolyse ou le cycle de Krebs pour l'ATP. En réponse à un stress, ils peuvent être sécrétés dans le milieu extracellulaire de plusieurs manières : par exocytose (constitutive ou régulée par le calcium) ou par un phénomène de diffusion facilitée (Akopova *et al.* 2012; Bodin & Burnstock 2001; Coco *et al.* 2003). Dans ce dernier cas, les nucléotides sont libérés par les hémicanaux connexine-43 et pannexine-1. La connexine-43 est une protéine

transmembranaire impliquée dans les jonctions communicantes, mais aussi dans des hémicanaux non-jonctionnels. Les connexines phosphorylées maintiennent les hémicanaux fermés et c'est leur déphosphorylation suite à un stress qui permet l'ouverture et la libération de nucléotides entre autres (Idzko *et al.* 2014). Les pannexines-1 sont des canaux transmembranaires qui connectent l'espace extracellulaire au compartiment intracellulaire permettant le passage d'ions et de petites molécules. Une fois dans le milieu extracellulaire, les nucléotides sont rapidement dégradés par les ectonucléotidases. Leur action est donc paracrine et autocrine, c'est-à-dire qu'ils activent les récepteurs à proximité du lieu de sécrétion.

L'équipe de Pellegatti a montré que les nucléotides sont retrouvés en grand nombre dans le microenvironnement tumoral.

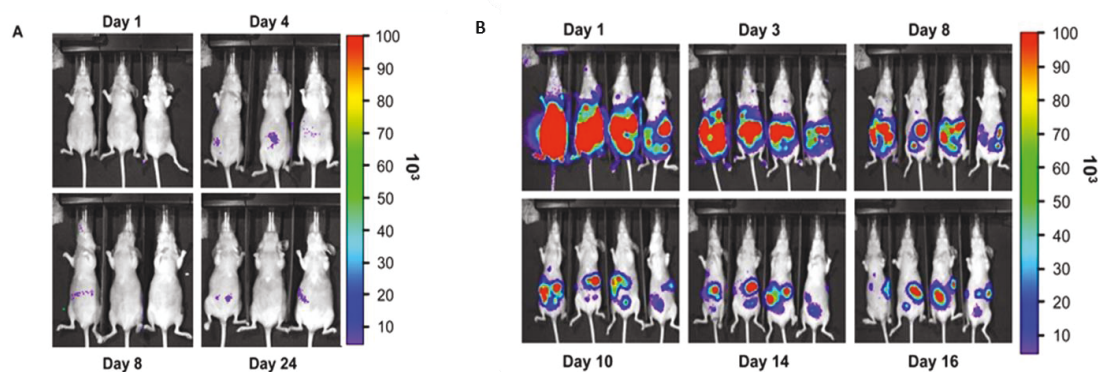


Figure 6 : Imagerie de souris nues porteuses de tumeurs ovariennes, dans lesquelles ont été injectées des cellules HEK-293-pmeLUC, senseurs de l'ATP. A) Souris nues saines dans lesquelles ont été injectées en intra-péritonéale, 2×10^6 cellules HEK-293-pmeLUC. Les animaux ont été monitorés pendant trois mois, seulement quatre mesures sont présentées. **B)** Souris nues dans lesquelles ont été injectées en intra-péritonéale, des cellules cancéreuses ovariennes humaines OVCAR-3 (1.5×10^6). 20 jours après l'implantation, ont été injectées 2×10^6 cellules HEK-293-pmeLUC en intra-péritonéale puis de la D-luciférine. Les souris porteuses des cellules OVCAR-3 ont été monitorées pendant 16 jours puis euthanasiées (adapté de Pellegatti *et al.* 2008).

Les nucléotides extracellulaires sont des molécules de signalisation endogènes qui produisent leurs effets par l'activation sélective des récepteurs nucléotidiques. Nous retrouvons deux grandes familles de récepteurs soient les récepteurs P1 et P2.

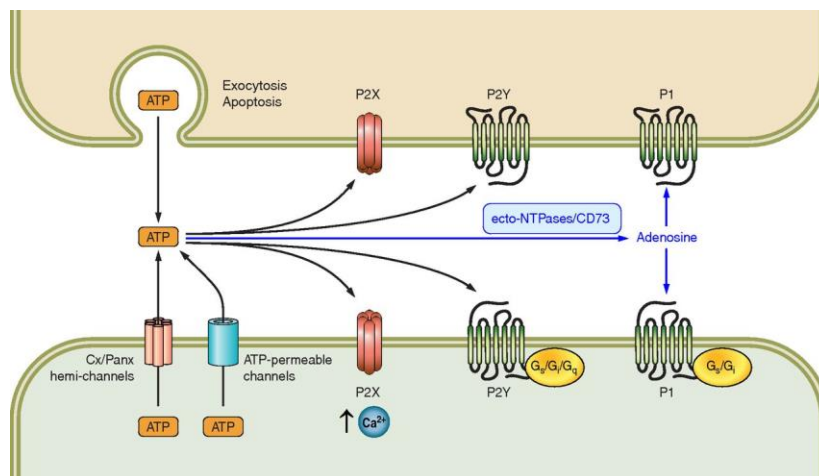


Figure 7 : Les différents récepteurs nucléotidiques et nucléosidiques activés par les nucléotides extracellulaires. Seul l'ATP est indiqué sur la figure, mais d'autres nucléotides comme l'ADP, l'UTP ou l'UDP peuvent être sécrétés dans le milieu extracellulaire et activer les récepteurs à proximité. La 5'-nucléotidase ou CD73 est l'ectonucléotidase qui hydrolyse l'AMP en adénosine (Lu & Insel 2014).

Les récepteurs P1

Les récepteurs P1 sont activés par les nucléosides (adénosine et uridine) et les nucléotides mono-phosphate. Les plus connus sont les récepteurs A1, A2A, A2B et A3 qui sont activés par l'adénosine. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) possédant sept domaines transmembranaires avec le domaine N-terminal extracellulaire et le domaine C-terminal intracellulaire. Les récepteurs A2A et A2B sont couplés à la protéine $G_{\alpha s}$. L'activation de la protéine $G_{\alpha s}$ provoque une augmentation de la production d'AMPc et une activation de la PKA. Il s'en suit la phosphorylation du facteur de transcription CREB et enfin la transcription de gènes cibles responsables, entre autres, de la prolifération cellulaire. Les récepteurs A1 et A3 quant à eux, sont couplés à une protéine $G_{\alpha i/o}$ provoquant l'effet inverse : une diminution de production d'AMPc.

Les récepteurs P2

La deuxième grande classe de récepteurs nucléotidiques est formée par les récepteurs P2 ayant pour substrats des nucléotides di- et triphosphates. Ils sont divisés en deux sous-types : P2X et P2Y.

Les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropiques, possédant deux domaines transmembranaires, qui s'ouvrent après s'être liés à l'ATP et permettent le passage d'ions (canaux ligand-dépendants). Chez les vertébrés sept gènes codent pour sept sous-unités qui vont s'associer entre elles de façon à former des homo- ou hétéro-oligomères (Roberts *et al.* 2006). Ils sont exprimés dans de nombreux types cellulaires comme, par exemple, dans le muscle lisse où ils répondent à la sécrétion d'ATP par les nerfs moteurs sympathiques, ou dans les nerfs sensitifs des viscères où ils jouent un rôle de senseurs de dommages tissulaires (Chen *et al.* 2002).

Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont des RCPG à sept passages transmembranaires. Tout comme les récepteurs à l'adénosine mentionnés plus tôt, ils déclenchent une cascade de signalisation intracellulaire via leur protéine G. La protéine G est constituée de trois sous-unités : α , β et γ . Les sous-unités β et γ participent à signalisation, mais c'est la sous-unité α qui assure la spécificité du récepteur. Lorsqu'un agoniste se lie à un RCPG, cette dernière est activée et les sous-unités β et γ se dissocient de la sous-unité α . Selon la spécificité de celle-ci s'en suivent différents effets.

La protéine $G_{\alpha s}$ active l'adénylcyclase entraînant l'augmentation de la production d'AMPc. L'AMPc est ensuite responsable de l'activation des protéines EPAC et de l'ouverture des canaux CNG (Baumann *et al.* 1994; de Rooij *et al.* 1998). De plus, comme décrit précédemment, l'AMPc va activer la PKA qui a plusieurs cibles telles que le facteur de transcription CREB (Delghandi *et al.* 2005).

La protéine G α i a l'effet inverse, car elle inhibe l'adénylcyclase, diminuant ainsi la production d'AMPc (Taussig *et al.* 1993).

La protéine G α q est responsable de l'activation de la PLC qui va cliver le PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ se fixe alors sur ses récepteurs du réticulum endoplasmique et entraîne le relargage du calcium du réticulum dans le cytoplasme. Le DAG participe à l'activation des PKC classiques et nouvelles résultant à son tour à la stimulation de nombreuses voies de signalisation, dont les voies Raf/MEK/ERK et Wnt/ β -caténine.

Enfin, la protéine G α 12/13 active les petites protéines G Rho participant ainsi à la signalisation dépendante des contacts cellules-cellules et cellules-matrice. Ces interactions sont médiées par les cadhérines (Kimura *et al.* 2011). Elles peuvent donc être impliquées dans la migration cellulaire, progression tumorale, l'invasion et la formation de métastases (Gurzu *et al.* 2016).

Comme les récepteurs P1, le domaine N-terminal des récepteurs P2Y est extracellulaire et le domaine C-terminal, intracellulaire. Huit récepteurs P2Y ont été identifiés chez les mammifères : P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄. Le récepteur P2Y₆, auquel nous allons nous intéresser dans cette étude, est préférentiellement couplé à une protéine G α q et est le seul à avoir l'UDP pour agoniste naturel (Cox *et al.* 2005).

Le récepteur P2Y₆

Le gène *P2RY6* est situé sur le bras long du chromosome 11 (locus 11q13.5) dans une zone d'instabilité chromosomique. Le récepteur P2Y₆ est préférentiellement couplé à une protéine G α q entraînant les effets décrits précédemment. L'activation de phospholipase C β entraîne le clivage du PIP₂ en IP₃ et DAG (Figure 8). L'IP₃ provoque le relargage du calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme et le DAG active la PKC. La PKC active à son tour plusieurs voies de signalisation dont la voie Raf/MEK/ERK. Cette cascade

de phosphorylation est responsable de l'activation de plusieurs facteurs de transcription. CREB a déjà été mentionné, mais les facteurs de transcription de la famille FOS sont également des messagers importants. Ces derniers dimérisent avec les facteurs de transcription de la famille JUN et entraînent la transcription de plusieurs gènes cibles, impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie, associés à l'hypoxie ou à l'angiogenèse (Vleugel *et al.* 2006).

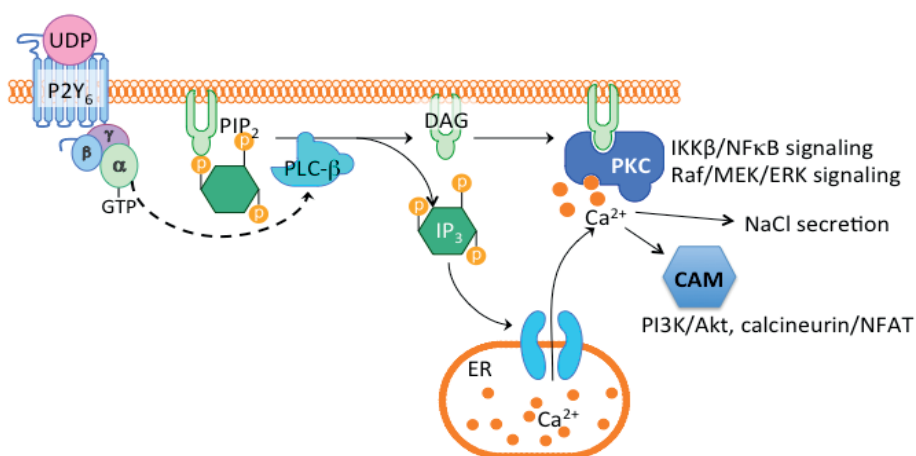


Figure 8 : Voie de signalisation déclenchée par l'UDP.

Le récepteur P2Y₆ est exprimé de façon relativement ubiquitaire dans l'organisme. Comme le montre la Figure 9, il est surtout exprimé dans le rein, la rate et le placenta, mais il est également bien présent dans les poumons et l'intestin (Moore *et al.* 2001).

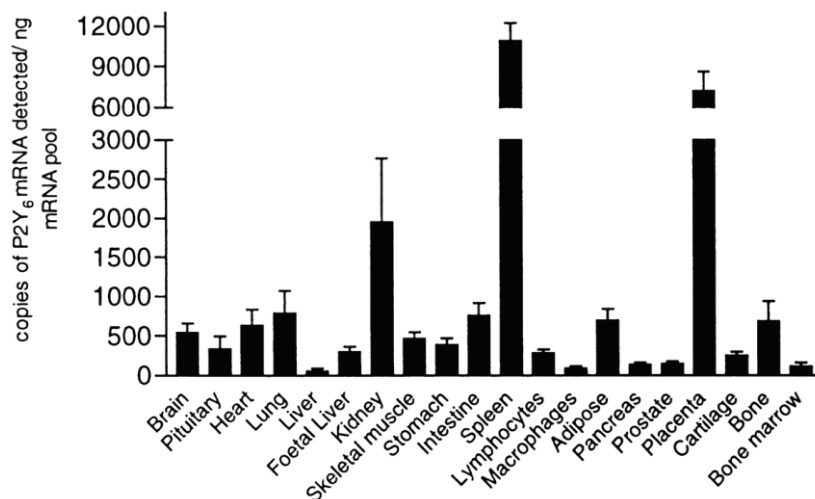


Figure 9 : Analyses de PCR quantitative présentant la quantité de transcrits du gène *P2RY6* dans différents tissus. Les gènes de la L-actine, de GAPDH et de la cyclophiline ont été utilisés comme contrôles. Le niveau d'expression d'ARNm a été mesuré dans 20 tissus périphériques humains distincts. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne (\pm SEM) du nombre de copies d'ARNm détectées dans quatre individus sains, pour chaque tissu (adapté de Moore *et al.* 2001).

Sa distribution dans de nombreux tissus entraîne une grande variété d'effets. L'équipe de Bar a montré un rôle du récepteur P2Y₆ dans la contraction du muscle lisse d'aorte de souris (Bar *et al.* 2008). Après avoir isolé un segment d'aorte, la réponse contractile en réponse différents nucléotides a été mesurée. En comparant des souris de type sauvage et des souris invalidées pour P2Y₆, ils ont observé que l'ATP et l'ADP n'entraînaient aucune réponse. Cependant, l'UDP provoque une contraction musculaire, non observée chez les souris invalidées pour P2Y₆ (Figure 10). Le muscle lisse semble aussi répondre à l'UTP, mais de manière plus tardive. Ceci peut être expliqué par l'hydrolyse de l'UTP en UDP par les ectonucléotidases, qui va ensuite activer le récepteur P2Y₆ (Bar *et al.* 2008).

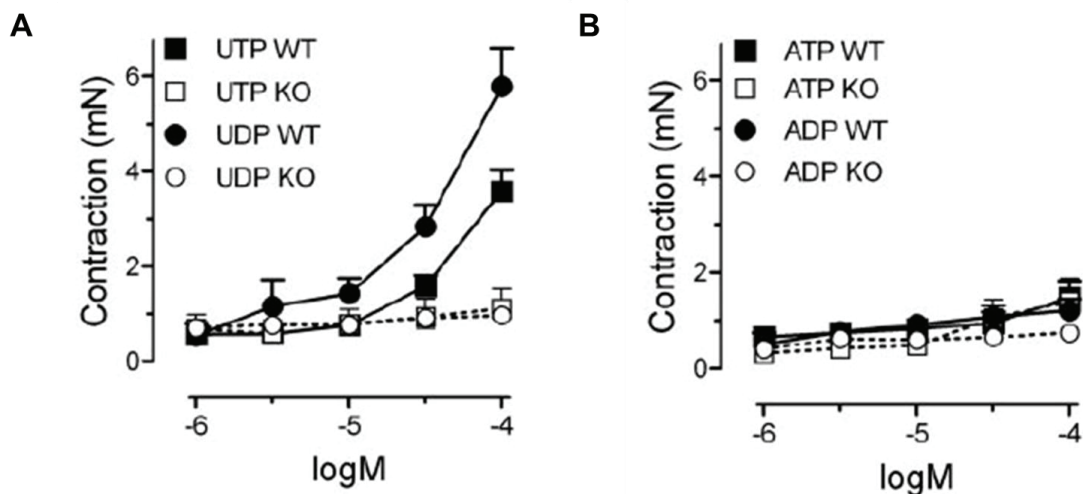


Figure 10 : Réponses contractiles induites par ATP, ADP, UTP et UDP d'un segment d'aorte de souris de type sauvage ou invalidées pour P2Y₆. L'aorte isolée a été placée dans un bain avec une solution de Krebs-Ringer et la tension mesurée avec un capteur de force relié à un système d'acquisition des données (adapté de Bar *et al.* 2008).

Dans l'intestin, le récepteur P2Y₆ dans le système nerveux entérique contrôle la motilité intestinale (Burnstock 2008) et module la sécrétion de chlorure de sodium par les cellules épithéliales (Figure 11; Köttgen *et al.* 2003).

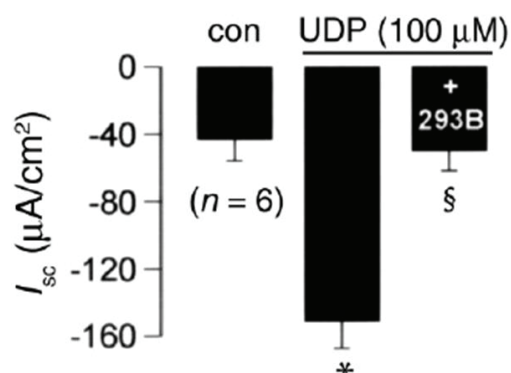


Figure 11 : Le récepteur P2Y₆ participe au transport ionique dans la muqueuse colorectale de rat, placée en chambre Ussing. Le 293B (10 μM) réduit l'effet de l'UDP sur l'intensité du courant. Avec con : contrôle (adapté de Köttgen *et al.* 2003).

Kottgen et ses collaborateurs ont isolé la muqueuse colorectale de rat en chambre de Ussing et mesuré la variation d'intensité du courant, correspondant au transport ionique en

réponse à différents nucléotides. L'UDP entraîne l'activation du transport ionique comme le montrent les variations de courant (Figure 11). L'effet est inhibé par la molécule 293B, un inhibiteur spécifique des canaux potassium nécessaires à l'absorption des ions K^+ qui permet aux canaux CFTR de sécréter les ions chlore.

Un ancien membre de notre laboratoire a démontré que l'activation du récepteur $P2Y_6$ aggrave les symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin en participant à la création d'un environnement pro-inflammatoire. Des souris ont été traitées au DSS de façon chronique pendant neuf semaines afin de générer chez les animaux une inflammation de l'épithélium intestinal. Lors de la dixième semaine, les souris sont traitées à l'UDP. Le score histologique est alors calculé et comparé entre les souris de type sauvage et celles invalidées pour $P2Y_6$. Le score histologique est calculé selon plusieurs critères : la longueur du côlon, la consistance des fèces et la présence ou non de sang, la variation de poids de l'animal et l'apparition ou non d'un saignement rectal. La Figure 12 montre une augmentation du score histologique chez les souris traitées à l'UDP comparativement aux souris contrôles traitées au PBS. De plus, lorsque les souris sont traitées avec le MRS2578, un antagoniste pharmacologique du récepteur $P2Y_6$, le score histologique diminue de façon significative, suggérant que le récepteur $P2Y_6$ est bien à l'origine de l'aggravation des symptômes.

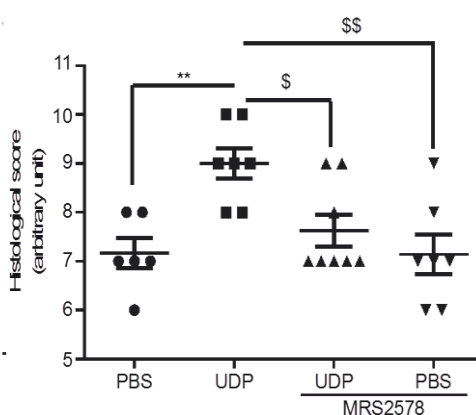


Figure 12 : Score histologique de souris traitées au DSS ou au PBS (souris contrôles) pendant neuf semaines. Les animaux ont été traités à l'UDP ou au PBS pendant la dixième semaine avec sans MRS2578, un antagoniste pharmacologique spécifique à $P2Y_6$. On observe une augmentation du score histologique chez les souris traitées à l'UDP

comparativement aux souris contrôles et pas d'augmentation chez les souris traitées avec l'antagoniste de P2Y₆ (Grbic *et al.*, non publié).

La quantité de transcrits de *P2RY6* a également été mesurée dans des tissus humains (Figure 13). Les résultats obtenus semblent en accord avec ceux observés chez les souris puisqu'on observe une augmentation de transcrits chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin.

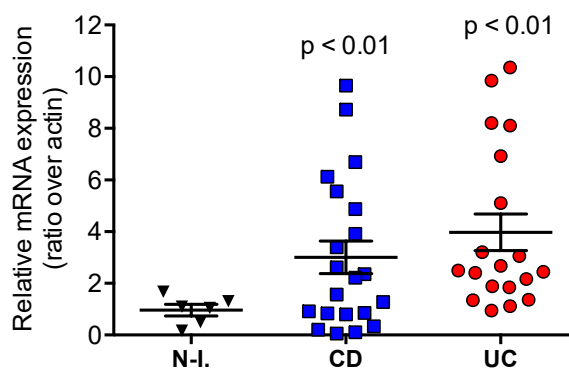


Figure 13 : L'inflammation intestinale provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur P2Y₆. L'expression de l'ARNm du récepteur P2Y₆ est augmentée dans les tissus de patients atteints de la maladie de Crohn et de colite ulcéreuse, comparativement aux tissus non inflammés (contrôles). Les barres horizontales représentent la moyenne de l'expression de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression de l'actine. La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un test *t* non pairé où * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (adapté de Grbic *et al.* 2008).

Le récepteur P2Y₆ serait donc capable d'aggraver les symptômes de l'inflammation. Comme c'est le cas dans le cancer colorectal associé à la colite, un épithélium inflammé peut devenir cancéreux. Dans ce type de cancer, le gène *TP53* est muté de façon précoce et régule l'expression de nombreux gènes.

P53

Le facteur de transcription p53 est surnommé « gardien du génome », car c'est l'un des principaux suppresseurs de tumeur dans les cellules. Situé sur le chromosome 17, le gène

TP53 est muté dans plus de 50% des cancers humains (Coffill *et al.* 2012). Dans des conditions normales, p53 est maintenue à de faibles niveaux dans la cellule. La protéine MDM2, une ubiquitine ligase, bloque le domaine N-terminal de transactivation et ubiquitine les résidus lysine du domaine C-terminal. P53 et MDM2 sont alors exclues du noyau et ciblées pour la dégradation par le protéasome (O'Brate & Giannakakou 2003). Suite à un signal, comme un dommage à l'ADN, p53 est stabilisée via de nombreuses modifications post-traductionnelles catalysées par plusieurs enzymes telles que des kinases, phosphatases, acétyltransferases, etc. Par exemple, Gu et Roeder ont montré que p300 était capable d'acétyler p53 sur un site situé dans son domaine C-terminal. L'acétylation de p53 stimulerait sa liaison à l'ADN, probablement en entraînant un changement de conformation de la protéine (Gu & Roeder 1997). Lorsque les facteurs de transcription p53 transloquent au noyau, ils s'associent en tétramères. Cette structure particulière permet de cacher le signal NES afin que les protéines restent dans le noyau (Stommel *et al.* 1999). Le tétramère se lie alors à l'ADN et entraîne la transcription des gènes cibles responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (Giono & Manfredi 2006). La cellule va réparer les dommages à l'ADN ou entrer en apoptose si les dommages sont trop importants (Fridman & Lowe 2003). Le gène codant pour la protéine MDM2 est également transcrit, il y a donc un phénomène de rétrocontrôle négatif (Kubbutat *et al.* 1997). P53 possède plusieurs domaines fonctionnels (Freed-pastor & Prives 2012), représentés plus tard sur la Figure 14 :

- le domaine de transactivation N-terminal, bloqué par MDM2 ;
- un domaine riche en proline nécessaire pour l'entrée en apoptose (Zhu *et al.* 2000) ;
- le domaine de liaison à l'ADN ;
- un domaine de tétramérisation ;
- le domaine C-terminal de régulation négative, car les résidus lysine sont ubiquitinilés par MDM2 ;
- le signal NES se trouve dans la région N-terminale ;
- le signal NLS se situe entre le domaine de liaison à l'ADN et la région C-terminale.

Dans les cancers, la majorité des mutations se retrouvent dans le domaine de liaison à l'ADN (Freed-pastor & Prives 2012) comme le montre la Figure 14. Les acides aminés

les plus souvent touchés sont les arginines 175, 248, 249, 273 et 282, ainsi que la glycine 245.

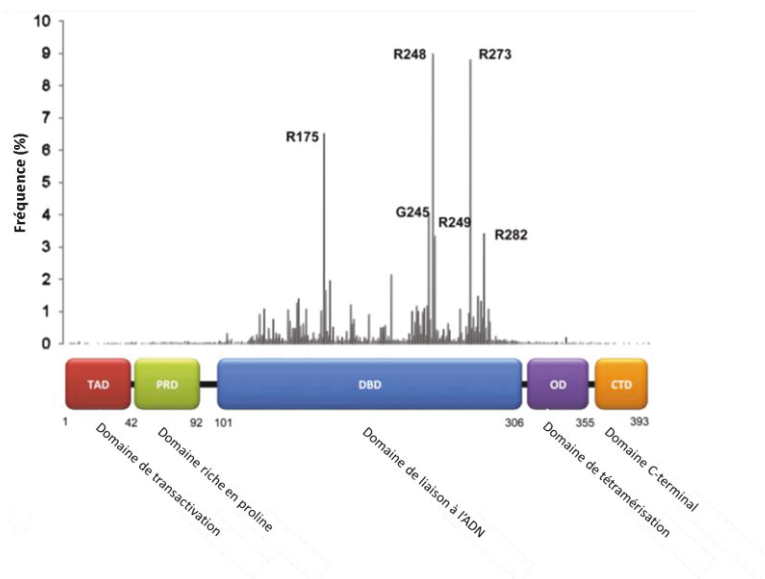


Figure 14 : Les différents domaines fonctionnels de la protéine p53 et la fréquence des mutations associées. La majorité des mutations dans le cancer, se retrouvent dans le domaine de liaison à l'ADN. Avec R : arginine, G : glycine (adapté de Freed-Pastor & Prives 2012).

Les mutations entraînent divers effets amenant la déstabilisation de la protéine, une perte de capacité de liaison à l'ADN ou son exclusion du noyau. Les mutants auxquels nous nous intéressons ici sont les mutants gain-de-fonction qui peuvent également agir de différentes manières comme le montre la Figure 15.

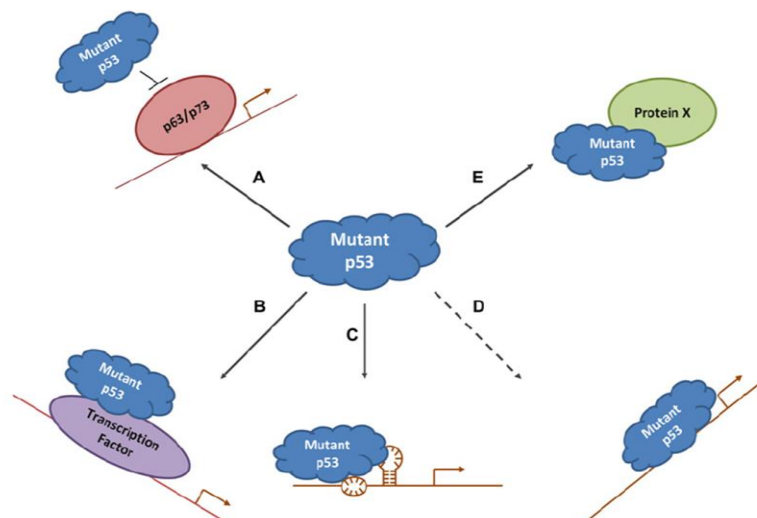


Figure 15 : Différents mécanismes d'action des mutant gain-de-fonction de p53. A) Interaction avec des membres de la famille p53 : p63 et p73 pour éviter la transactivation de leurs gènes cibles. B) Interaction ou recrutement par d'autres facteurs de transcription menant à une activation de leurs gènes cibles. C) Liaison à des motifs structuraux spécifiques et activation de la transcription. D) Liaison à des séquences d'ADN spécifiques aux protéines mutées. E) Interaction avec d'autres protéines (adapté de Freed-Pastor & Prives 2012).

Dans certains cas, les mutants gain-de-fonction interagissent avec des membres de la famille de p53, comme p63 et p73 et empêchent la transactivation de leurs gènes cibles, comme c'est le cas avec le mutant R282W (Gaiddon *et al.* 2001). Des interactions avec d'autres facteurs de transcription ont également été observées, menant cette fois à l'activation de leurs gènes cibles. Par exemple, le mutant R273H est capable d'interagir avec le facteur de transcription Ets-1, impliqué dans la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire, la migration et l'apoptose. Par la suite, il a été suggéré que les protéines mutées pouvaient se lier à des motifs structuraux particuliers. Ce serait le cas pour les régions MAR qui sont l'équivalent du cytosquelette dans le noyau et donc joue un rôle dans la structure plus ou moins compactée de la chromatine. Les protéines mutées seraient aussi capables de se lier à des séquences spécifiques d'ADN différentes de celles sur lesquelles se lie la protéine de type sauvage. Cependant, il est difficile d'affirmer s'il s'agit de liaison directe ou par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription par exemple. Enfin, les mutants gain-de-fonction seraient capables d'interagir avec d'autres protéines. Plusieurs

mutants ont la capacité d'interagir avec la protéine TopBP1, une enzyme qui agit entre autres pendant la réplication et qui sert de protéine d'échafaudage entre la protéine p53 mutée et NF-Y. Cette dernière est un facteur de transcription ciblant des gènes codant pour des protéines liées au cycle cellulaire comme la cycline A, la cycline B ou cdk1 (Liu *et al.* 2011).

Ainsi, non seulement les protéines mutées peuvent avoir des effets différents de la protéine sauvage, mais l'équipe de Chan en 2004 a démontré que les mutants entraînent en compétition avec les protéines de type sauvage lors de la formation du tétramère qui se lie à l'ADN. Ainsi, si un mutant gain-de-fonction a perdu sa capacité de liaison à l'ADN et qu'il s'associe aux protéines normales, celles-ci perdent également leur capacité de liaison à l'ADN. C'est le cas du mutant R249S qui entraîne un changement dans la structure de la protéine. Cependant, ils ont démontré que le mutant R273H conservait sa capacité de liaison à l'ADN et qu'il pouvait également se lier à d'autres séquences cibles, sur lesquelles, la protéine p53 normale ne se lie pas (Zhu *et al.* 2015).

La transcription

L'ARN polymérase et les facteurs de transcription

L'enzyme responsable de la transcription des gènes est l'ARN polymérase. Il en existe trois types chez les vertébrés :

- l'ARN polymérase I, responsable de la transcription des ARN 5,8S, 18S et 28S ;
- l'ARN polymérase II, responsable de la transcription des tous les gènes codant pour des protéines ;
- l'ARN polymérase III, responsable de la transcription des ARN de transfert, des ARN 5S.

L'ARN polymérase se fixe sur les promoteurs. Ceux-ci sont des régions d'ADN contenant les éléments nécessaires à l'initiation de la transcription tels que les sites de reconnaissance de l'ARN polymérase, la boîte TATA par exemple, et plusieurs séquences

consensus permettant la liaison de différents facteurs de transcription. Une fois associée au promoteur, l'ARN polymérase recrute les facteurs généraux de transcription. Comme mentionné juste avant, ces facteurs reconnaissent des séquences particulières d'ADN. À chacun d'eux est associée une séquence consensus, c'est-à-dire un motif particulier reconnu spécifiquement par un facteur de transcription. Cependant, ces séquences ne sont pas identiques d'un promoteur à l'autre, mais partagent une forte homologie.

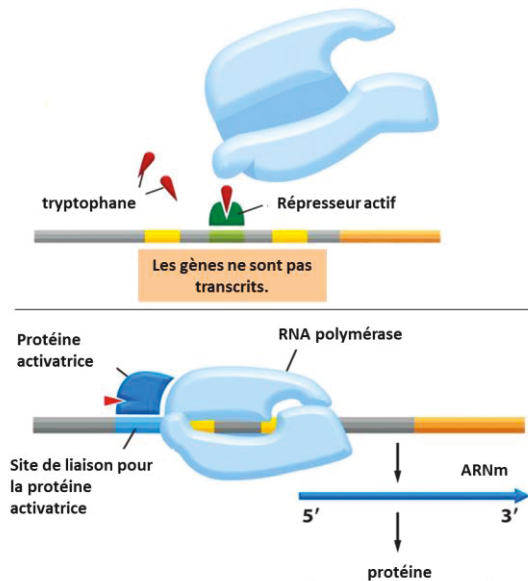


Figure 16 : La transcription est médiée par l'ARN polymérase II. Le panel du haut montre un répresseur qui inhibe la transcription. À la suite d'un signal, ici la liaison d'une protéine activatrice (un facteur de transcription par exemple), l'ARN polymérase se fixe sur le promoteur d'un gène comme le montre le schéma du bas. La transcription démarre alors au site d'initiation de la transcription et un ARNm est synthétisé. Il sera traduit plus tard en protéine (adapté de Alberts *et al.* 2008).

Les facteurs de transcription sont caractérisés par la présence de deux domaines intrinsèques : le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation. Le domaine de liaison à l'ADN reconnaît les séquences consensus mentionnées plus haut, mais également d'autres éléments régulateurs comme des éléments *enhancer* provoquant l'activation de la transcription, ou des éléments *silencer* responsables de l'inhibition de la transcription. Le domaine de transactivation est une région qui permet l'interaction locale avec d'autres protéines liées à l'ADN ou impliquées dans le recrutement du complexe

d'initiation de la transcription. Une fois la machinerie transcriptionnelle en place, la transcription commence au site d'initiation de la transcription ou +1 et un ARN messager va être généré (Kornblihtt *et al.* 2013). Cependant, pour permettre le recrutement des protéines nécessaires à la transcription, la chromatine doit être dans un état décompacté. L'épigénétique représente les modifications d'état subies par la chromatine, régulant l'expression des gènes (Tollefsbol 2010).

L'épigénétique

L'épigénétique définit les modifications de l'ADN transmissibles et réversibles influençant l'expression des gènes sans affecter leur séquence nucléotidique. C'est le fait que certains gènes s'expriment ou non en fonction du développement, du type cellulaire ou de l'environnement (Peter A Jones 2012). La chromatine peut se trouver dans un état compacté ou décompacté, rendant l'ADN accessible ou non à la machinerie transcriptionnelle. Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine. Il est formé de huit histones autour desquels s'enroule l'ADN. Les histones H2A et H2B s'organisent en deux dimères et deux histones H3 ainsi que deux histones H4 forment un tétramère (Tollefsbol 2010). L'histone H1 se fixe autour du nucléosome et à l'ADN de liaison (*linker DNA*) et participe ainsi à la stabilisation du nucléosome (Berezney & Jeon 1995). Ce dernier représente le premier niveau de compaction de la chromatine. La région N-terminale des histones peut subir différentes modifications post-traductionnelles influençant ainsi la compaction de la chromatine. Les plus connues sont les suivantes (Figure 17 ; Maddox *et al.* 2013) :

- l'acétylation est médiée par les protéines HAT (*Histone acetyltransferase*) et déstabilise les histones ;
- la désacétylation est médiée par les protéines HDAC (*Histone deacetylase*) et compacte la chromatine ;
- la méthylation est médiée par les protéines HMT (*Histone Methyltransferase*) ;
- enfin, les protéines HDM (*Histone Demethylase*) sont responsables de la déméthylation des histones.

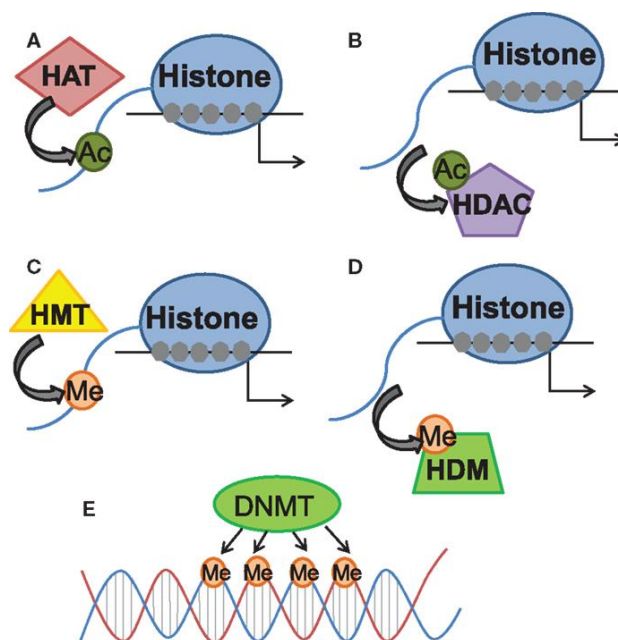


Figure 17 : Représentation des principales modifications post-traductionnelles subies par les histones et de la méthylation de l'ADN ainsi que les enzymes catalysant les différentes réactions (Maddox *et al.* 2013).

Les effets engendrés par ces différentes modifications varient avec le contexte. Selon les combinaisons, ces changements peuvent entraîner l'activation ou l'inhibition de la transcription (Kouzarides 2007). Contrairement à la méthylation de l'ADN, via les DNMT, associée plutôt à la répression transcriptionnelle (Peter A. Jones 2012). Notons que si le gène méthylé code pour un répresseur, l'effet biologique entraîné par l'inhibition de sa transcription peut être activateur.

L'équipe de Zhu en 2016 a démontré que le mutant $p53^{R273H}$ pouvait entraîner des modifications épigénétiques (Figure 18 ; Zhu *et al.* 2015).

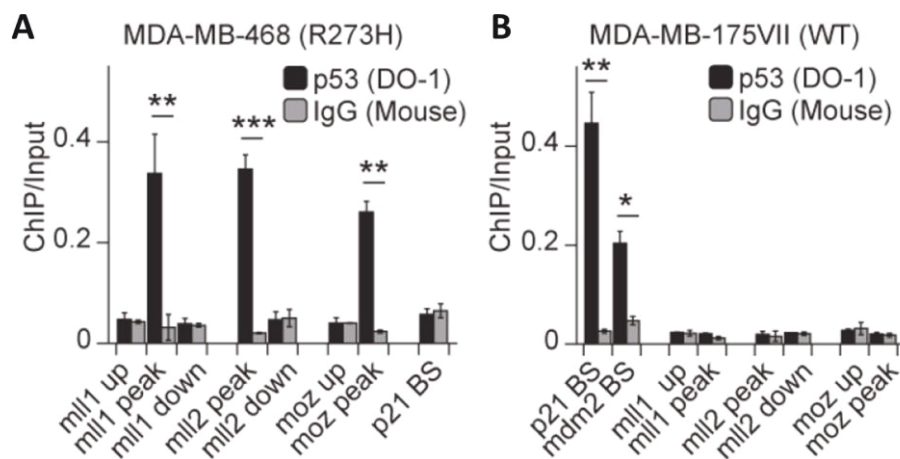


Figure 18 : Le mutant p53R273H cible directement des régulateurs de la chromatine. Expériences de ChIP suivies de qPCR représentant l'enrichissement obtenu avec p53 ou un contrôle IgG, normalisé par rapport à l'input dans **A)** des cellules MDA-MB-468 exprimant p53^{R273H} et **B)** dans des cellules MDA-MB-175VII exprimant p53 normale. Avec BS : *p53 binding site* (site de liaison de p53) (adapté de Zhu *et al.* 2015)

Une immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage à haut débit sur tout le génome dans des lignées cellulaires cancéreuses de sein a permis d'identifier les régions de liaison de la protéine p53 sur l'ADN. Parmi les résultats, des gènes reliés à la méthylation des histones (*mll1*, *mll2*) et *moz*, codant pour une protéine HAT, ont été identifiés. Par la suite, une seconde immunoprécipitation de la chromatine a été faite suivie cette fois d'une expérience de qPCR, sur deux lignées cellulaires cancéreuses de sein : MDA-MB-468 exprimant p53^{R273H} et les MDA-MB-175VII exprimant p53 normale. La Figure 18 nous montre la quantification d'ADN des régions identifiées précédemment ainsi que des régions en amont et en aval. Le promoteur de p21 sert ici de contrôle positif, car c'est une cible bien connue de p53 (Kaeser & Iggo 2002). Nous pouvons voir sur la Figure 18A que les cellules exprimant le mutant p53^{R273H} sont enrichies pour les gènes *mll1*, *mll2* et *moz* comparativement au contrôle négatif IgG. Ce n'est pas le cas dans les cellules exprimant la protéine p53 de type sauvage. Ces observations supportent le concept que le mutant R273H a d'autres cibles dans l'ADN que celles identifiées pour la protéine p53 de type sauvage et qu'il pourrait induire des modifications de structure de la chromatine pouvant potentiellement modifier l'expression de plusieurs gènes.

En résumé, nous avons vu que l'expression des gènes et des protéines pouvait être régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription ou par des modifications épigénétiques. Il existe cependant plusieurs autres niveaux de régulation possibles, comme montré sur la figure 19. Une fois synthétisés, les ARNm sont épissés, c'est-à-dire que les introns sont excisés pour ne garder que les exons codants pour une protéine. Les ARN messagers matures sont ensuite transportés au cytoplasme pour être traduits en protéine. Chaque étape représente un niveau de régulation. Enfin, même si une protéine est synthétisée, il est possible que celle-ci se trouve sous une forme inactive et nécessite un signal afin de remplir sa fonction (Alberts *et al.* 2008).

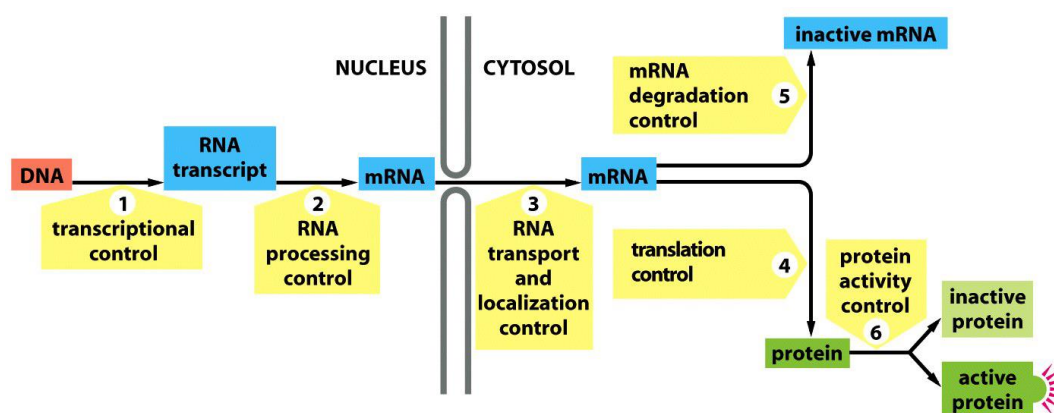


Figure 19 : Représentation des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes ou protéines (Alberts *et al.* 2008)

L'épissage alternatif

Ce qui nous intéresse maintenant, c'est l'épissage, représentant un des nombreux niveaux de régulation d'expression des gènes. Un même ARN peut donner différents ARNm matures. En partant d'un ARN nouvellement synthétisé, les introns peuvent être excisés de différentes manières et les combinaisons d'exons dans l'ARN messagers matures peuvent varier : c'est l'épissage alternatif (Figure 20). Les différents ARNm obtenus sont appelés variants d'épissage. Ils peuvent coder pour une même protéine ou non, ou encore pour des isoformes différentes (Le *et al.* 2015).

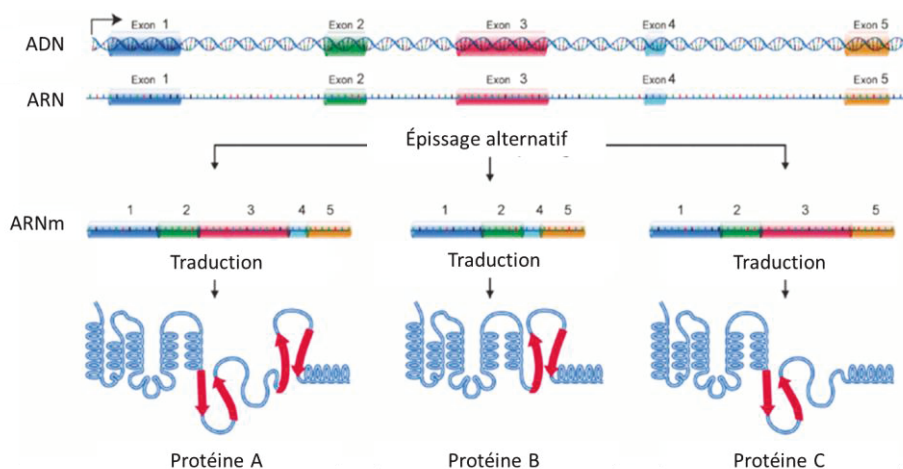


Figure 20 : Représentation de la synthèse d'un brin d'ARN et son épissage alternatif menant à trois protéines différentes (adapté de www.genome.gov).

Le gène humain *P2RY6* code pour 8 variants d'ARNm : 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 et 9. Tous les variants, excepté le 9, codent pour l'isoforme 1 du récepteur P2Y₆, de 328 acides aminés, forme connue et caractérisée du récepteur. Le variant 9 possède un site d'initiation de la traduction (codon ATG) différent des autres variants. Ainsi, il code pour l'isoforme 2 du récepteur P2Y₆, de 429 acides aminés, possédant une région N-terminale plus longue que l'isoforme 1. La fonction de l'isoforme 2 reste à caractériser. Selon la base de données NCBI, les variants semblent être associés à quatre régions promotrices potentielles de *P2RY6*. En effet, les variants 1,3, 6 et 8 semblent être transcrits à partir du même site d'initiation de la transcription. Ils représenteraient donc quatre variants d'épissage, différant les uns des autres par la taille de leur région 5'UTR, région du brin d'ARN se trouvant en amont du site d'initiation de la traduction. Le variant 1 est le plus court des huit variants d'ARN. Le variant 7 semblerait être transcrit à partir d'un +1 alternatif, tout comme le variant 2 ainsi que les variant 5 et 9, associés à une quatrième région promotrice potentielle. Ces hypothèses restent à vérifier, mais si ces variants sont bien générés depuis des sites d'initiation de la transcription différents, quels sont les paramètres qui déterminent le profil des variants d'une cellule ?

En résumé, nous avons vu que l'inflammation intestinale pouvait mener au cancer colorectal et que le récepteur P2Y₆ serait capable d'aggraver les symptômes

inflammatoires. Enfin, dans le cancer associé à l'inflammation, le gène *TP53* est muté de façon précoce et les mutants générés peuvent avoir d'autres cibles dans l'ADN que la protéine normale. Si le gène *P2RY6* est associé à plusieurs régions promotrices, le facteur de transcription p53 peut-il se lier à une ou plusieurs de ces régions ? Tous ces éléments nous mènent à l'**hypothèse** suivante :

La présence de *TP53* mutant va réguler de façon différentielle l'expression du gène *P2RY6* dans le cancer colorectal.

L'**objectif général** défini afin de vérifier cette hypothèse est le suivant : caractériser les mécanismes moléculaires liés à *TP53* régulant l'expression du gène *P2RY6* dans le cancer colorectal. Les **objectifs spécifiques** pour ce projet de recherche sont donc : **(1)** déterminer et caractériser les régions promotrices du gène *P2RY6* dans les cellules épithéliales intestinales cancéreuses et **(2)** étudier l'effet de la protéine p53 de type sauvage ou mutée sur l'expression du récepteur P2Y₆.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Cellules Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 (ATCC, HTB-37) est une lignée cellulaire épithéliale cancéreuse isolée d'un adénocarcinome de côlon humain. À l'atteinte de la confluence, les cellules Caco-2 ont la particularité d'entamer un processus de différenciation les menant à un phénotype mimant les entérocytes (Beaulieu & Quaroni 1991). Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) contenant 10% de FBS (Foetal Bovin Serum, Wisent), 2 mM de GlutaMax (Wisent), 0,01 M d'HEPES (Wisent) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère de 95% air et 5% CO₂. Les cellules ont été réensemencées à un ratio d'un pour cinq à 80% de confluence. Leur origine et les mutations des principaux oncogènes retrouvés dans le cancer colorectal sont présentées dans les Tableaux 1 et 2.

Cellules HCT 116

La lignée cellulaire HCT 116 (ATCC, CCL-247) est une lignée cellulaire épithéliale cancéreuse issue de carcinome colorectal humain. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Wisent) contenant 10% de FBS (Wisent), 2 mM de GlutaMax (Wisent), 0,01 M d'HEPES (Wisent) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère de 95% air et 5% CO₂. Les cellules ont été réensemencées à un ratio d'un pour dix à l'atteinte de la confluence. Leur origine et les mutations des principaux oncogènes retrouvés dans le cancer colorectal sont présentées dans les Tableaux 1 et 2.

Cellules HT-29

La lignée cellulaire HT-29 (ATCC, HTB-38) est une lignée cellulaire épithéliale cancéreuse issue d'un adénocarcinome colorectal humain. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Wisent) contenant 10% de FBS (Wisent), 2 mM de GlutaMax (Wisent), 0,01 M d'HEPES (Wisent) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère de 95% air et 5% CO₂. Les cellules ont été réensemencées à un ratio d'un pour huit à l'atteinte de la confluence. Leur origine et les mutations des principaux oncogènes retrouvés dans le cancer colorectal sont présentées dans les Tableaux 1 et 2.

Cellules HEK-293

La lignée cellulaire HEK-293 (ATCC, CRL-1573) est une lignée cellulaire épithéliale embryonique de rein humain. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Wisent) contenant 10% de FBS (Wisent), 2 mM de GlutaMax (Wisent), 0,01 M d'HEPES (Wisent) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère de 95% air et 5% CO₂. Les cellules ont été réensemencées à un ratio d'un pour dix à l'atteinte de la confluence. Leur origine et les mutations des principaux oncogènes retrouvés dans le cancer colorectal sont présentées dans les Tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Lignées cellulaires cancéreuses colorectales utilisées et leur origine (adapté de Ahmed *et al.* 2013).

Lignée cellulaire	Patient	Organe	Stade	Dérivé de	Référence
Caco-2		Côlon	Adénocarcinome colorectal		(Caro <i>et al.</i> 1995)
HCT 116	Homme, 48 ans	Côlon ascendant	Carcinome colorectal	Tumeur primaire	(Brattain, Fine, <i>et al.</i> 1981; Brattain, Brattain, <i>et al.</i> 1981; Eshleman <i>et al.</i> 1995)
HT-29	Femme, 44 ans	Côlon	Carcinome colorectal	Tumeur primaire	(Fogh & Trempe 1975)

Tableau 2 : Lignées cellulaires cancéreuses colorectales utilisées et leurs mutations dans les principaux oncogènes retrouvés dans le cancer colorectal. Avec : WT : wild type (type sauvage) ; E : Acide glutamique ; X : acide aminé non déterminé ; G : Glycine ; D : Acide aspartique ; H : Histidine ; R : Arginine ; V : Valine ; P : Proline ; T : Thréonine (adapté de Ahmed *et al.* 2013).

Lignées cellulaires	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>
Caco-2	WT	WT	WT	WT	E204X
HCT 116	G13D	WT	H1047R	WT	WT
HT-29	WT	V600E	P449T	WT	R273H

Détermination des sites d'initiation de la transcription par 5'-RACE

Les sites d'initiation de la transcription des différents variants d'ARNm du gène *P2RY6* ont été déterminés en utilisant le kit 5'/3' RACE 2nd Generation (ThermoFisher Scientific, Ottawa, On, Canada) selon les instructions du fabricant. L'ARN total de cellules Caco-2 confluentes a été isolé en utilisant le kit GeneJET ARN Purification Kit (ThermoFisher

Scientific), selon les instructions du fabricant. Une partie de l'ARN total obtenu a été purifié en utilisant le kit GenElute mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada), selon les instructions du fabricant, afin d'isoler l'ARNm. Ensuite, le protocole de 5' RACE, résumé sur la Figure 21, a été effectué. D'abord, un brin d'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de l'ARNm avec l'amorce suivante (Amorce 1), correspondant à une région du promoteur de *P2RY6* commune à tous les variants d'ARNm : 5'-GGTAGACACAGGTGGTGGGTGGCAAG-3'. L'ADN obtenu a été purifié en utilisant le kit GeneJET Purification Kit (ThermoFisher Scientific), selon les instructions du fabricant. Une queue poly(A) est ajoutée à l'ADN purifié, à l'extrémité 3' grâce à une enzyme Terminal Transferase recombinante et l'ajout de dATP. Une première amplification par PCR (PCR I) a été réalisée avec le système T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, États-Unis). La première amorce utilisée (Amorce 2) correspond à une région du promoteur de *P2RY6*, commune à tous les variants d'ARNm : 5'-GCCTGTGCCATTGTCCCATTTC-3'. La seconde amorce (nommée « Oligo(dT) et adaptateur » sur la Figure 21) est complémentaire à la queue poly(A) précédemment ajoutée sur le brin d'ADNc et contient une séquence supplémentaire qui servira d'adaptateur pour une seconde amorce lors de la deuxième amplification : 5'-GACCACGCGTATCGAATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3' (V : A, C ou G). Une deuxième réaction PCR (PCR II) est exécutée avec une deuxième paire d'amorces. Ainsi, n'est sélectionné que l'ADN complémentaire aux deux paires d'amorces et l'amplification non spécifique est diminuée de façon importante. L'amorce sens est fournie par le kit et est complémentaire à la séquence portée par la première amorce, comme mentionné plus tôt : 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3', en combinaison avec les deux amorces suivantes correspondant à deux régions du promoteur de *P2RY6* interne à la zone précédemment ciblée, spécifiques aux variants 5 et 9 respectivement :

- variant 5 : 5'-GCCTGAACTCCGCCTTCCAAA-3'
- variant 9 : 5'-GTGGGTTTCCTATGTTTCAGGGAGGCCA-3'.

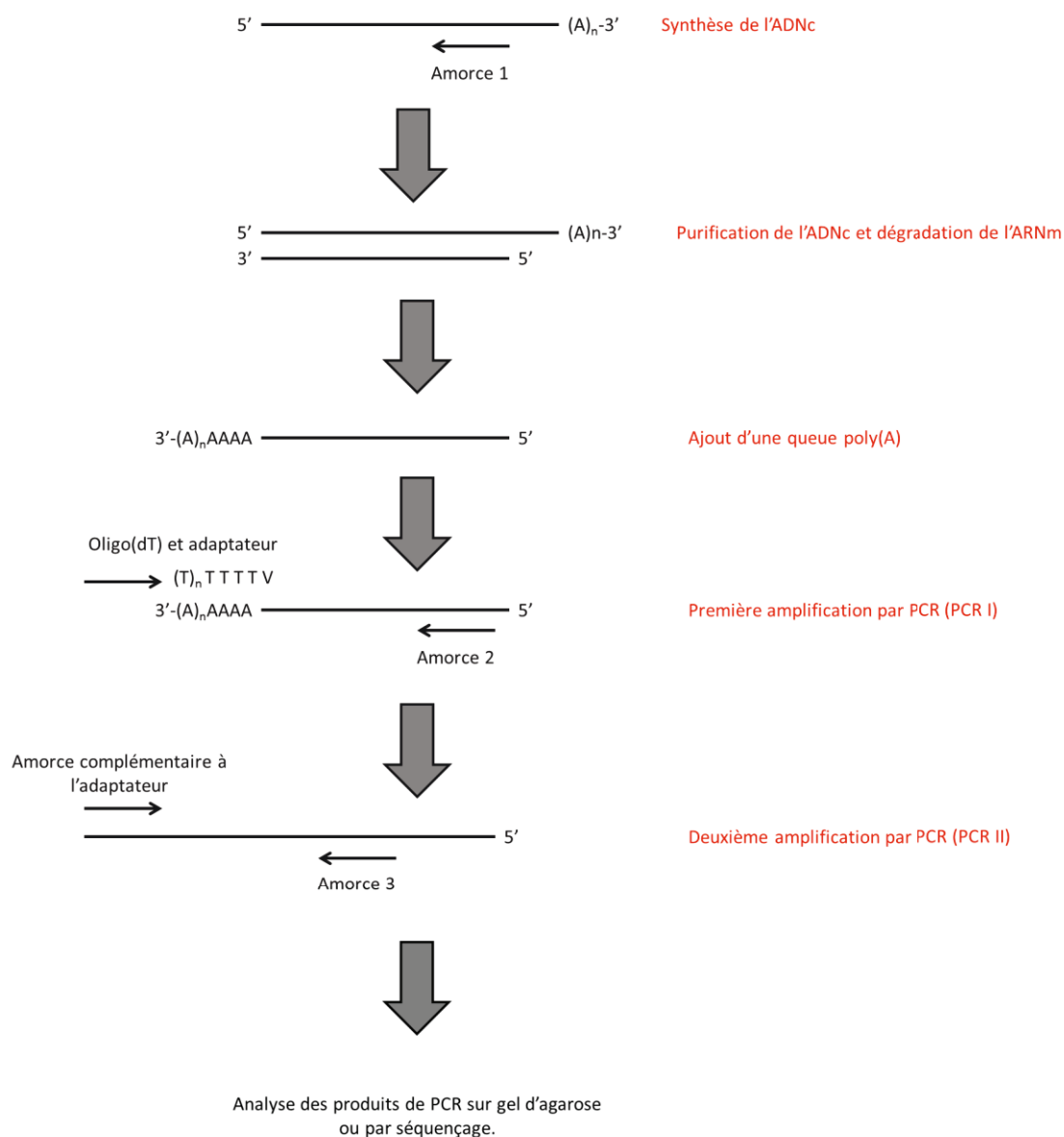


Figure 21 : Récapitulatif du protocole de l'expérience 5'RACE. Avec : V : A, C ou G (adapté du protocole du kit 5'/3' RACE, 2nd Generation, version 13, 2014, ThermoFisher Scientific).

Afin de valider les produits obtenus, une troisième amplification par PCR (PCR III) est effectuée avec des amorces chacune spécifique à un variant d'ARNm de *P2RY6*, soit :

- variant 5 : 5'-GCTCTGTGCTGTGGCAAGTTACT-3' ; 5'-GCCTGAACTCCGCCTTCCAAA-3'

- variant 9 : 5'-GCTCTGTGCTGTGGCAAGTTACT-3' ; 5'-GTGGGTTTCCTATGTTTCAGGGAGGCCA-3'.

Les produits obtenus sont chargés sur gel d'agarose 1,5% afin de visualiser la présence ou non des variants d'ARNm V5 ou V9 de *P2RY6* dans nos échantillons. Une fois leur présence confirmée, les produits de PCR II ont été clonés à l'aide de la trousse Zero Blunt® PCR Cloning kit (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Par la suite, les bactéries ont été sélectionnées par kanamycine. L'ADN a été isolé à partir des clones obtenus en utilisant la trousse GeneJET Plasmid Miniprep kit (ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant, validés par PCR avec les mêmes conditions que les PCR III, puis séquencés. Enfin, les séquences obtenues ont été analysées et ont servi à déterminer le site d'initiation de la transcription (+1). Les variants étudiés, leur taille et région promotrice associée, sont listés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6* étudiés dans l'expérience de 5'RACE, associés à la région promotrice 4 et leur taille.

Variants d'ARNm	Région promotrice associée	Taille
5	R4	250 pb
9		219 pb

Toutes les amplifications par PCR ont été réalisées avec l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Whitby, ON, Canada). Les produits de la PCR II peuvent ensuite être clonés et validés par séquençages.

Détermination du profil d'expression des variants d'ARNm de *P2RY6* dans des lignées cellulaires épithéliales intestinales cancéreuses.

L'ARN total des cellules HCT 116, HT-29 et Caco-2 a été isolé en utilisant le kit GeneJET ARN Purification Kit (ThermoFisher Scientific), selon les instructions du fabricant. L'ARN purifié a ensuite été envoyé à la plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada) afin de procéder à la quantification des variants 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 et 9 d'ARNm de *P2RY6*.

Clonage des quatre régions promotrices potentielles de *P2RY6*.

Tout d'abord, nous avons sélectionné les quatre sites d'initiation de la transcription potentiels (+1) suggérés par la base de données NCBI. Nous avons ensuite ciblé des régions allant d'environ -1500 à +200, pour chaque site, que nous avons nommé R1, R2, R3 et R4. Cela nous a permis d'élaborer des amorces spécifiques. Les amorces utilisées pour le clonage des régions 1 et 4 sont indiquées dans les Tableaux 4 et 5. Les régions 2 et 3 ont été clonées avec les paires d'amorces suivantes :

- R2 : 5'-ACTAGGTACCGGTGAGTCCCTGCATATG-3' ; 5'-ACTACTCGAGCAGCTTACCTCCAAGACTTGAG-3'
- R3 : 5'-ACTAGGTACCCACTATGTAAGCTGGCTGGAAGTG-3' ; 5'-ACTACTCGAGGAAGGCACTTACATATCAGGAG-3'

L'ADN de cellules Caco-2 a été purifié en utilisant le kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) puis amplifié par PCR avec les amorces précédemment citées. Les produits obtenus ont été clonés dans le vecteur pGL4.10[*luc2*] (Promega, Madison, WI, États-Unis) exprimant le gène *luc2* de la luciférase (*Photinus pyralis*). Des constructions plus courtes des régions 1 et 4 ont été obtenues par digestions avec des enzymes de restriction ou par sous-clonage. Les stratégies de clonage utilisées ainsi que la taille des constructions obtenues sont indiquées dans les Tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Stratégies de clonage des différentes constructions obtenues à partir de la région 1 du promoteur de *P2RY6*, dans le vecteur pGL4.10[*luc2*].

Taille de l'insert R1	Stratégie de clonage utilisée	Position dans le génome	Variants d'ARNm correspondants
1935 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCAGAATAAGGAGAATGAGTGCC-3' 5'-ACTACTCGAGTACACACATATGCAGGGACTC-3'	de 73 262 843 à 73 264 778 pb	1, 3, 6, 8
1535 pb	Enzymes de restriction (KpnI – AvrII)	de 73 263 243 à 73 264 778 pb	
635 pb	Enzymes de restriction (KpnI – NsiI)	de 73 264 143 à 73 264 778 pb	
177 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCTAGCAGCGCCTGGGCGAGTG-3' 5'-ACTACTCGAGTACACACATATGCAGGGACTC-3'	de 73 264 601 à 73 264 778 pb	
100 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCGCAGGTAAGGGCGTGCG-3' 5'-ACTACTCGAGTACACACATATGCAGGGACTC-3'	de 73 264 676 à 73 264 778 pb	

Tableau 5 : Stratégies de clonage des différentes constructions obtenues à partir de la région 4 du promoteur de *P2RY6*, dans le vecteur pGL4.10[*luc2*].

Taille de l'insert R4	Stratégie de clonage utilisée	Position dans le génome	Variants d'ARNm correspondants
2218 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCCCTGATATGTAAGTGCCTTCACTTC-3' 5'-ACTACTCGAGGTCGCGTGCAATGTTCTGGC-3'	de 73 270 147 à 73 272 365 pb	5, 9
1180 pb	Enzymes de restriction utilisées : KpnI – XmaI	de 73 271 185 à 73 272 365 pb	
918 pb	Enzymes de restriction utilisées : KpnI – PmlI	de 73 271 447 à 73 272 365 pb	
445 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCGAGTGAGCAAACAGAGGGTG-3' 5'-ACTACTCGAGGTCGCGTGCAATGTTCTGGC-3'	de 73 271 920 à 73 272 365 pb	
333 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCCTGAGAAAACCAGGTTAATGG-3' 5'-ACTACTCGAGGTCGCGTGCAATGTTCTGGC-3'	de 73 272 032 à 73 272 365 pb	
223 pb	Amorces utilisées : 5'-ACTAGGTACCAAACAGCCACCCAATGCGTG-3' 5'-ACTACTCGAGGTCGCGTGCAATGTTCTGGC-3'	de 73 272 142 à 73 272 365 pb	

Essais luciférase

Les cellules HCT 116 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits, à une quantité de 100 000 cellules par puits. Après 24 h, le milieu de culture DMEM (Wisent) a été remplacé par le milieu Extreme DMEM (Wisent). Les cellules ont été co-transfectées en utilisant l'agent de transfection X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific) à une concentration de 1 μ L pour 1 μ g d'ADN transfecté, avec :

- 1 ng du vecteur exprimant le gène *Renilla luciferase* ;
- 0,1 μ g du vecteur pGL4.10 vide ou contenant le promoteur *P2RY6* ;
- 0,1 μ g du vecteur pCMV-Neo-Bam vide ou contenant *TP53^{WT}* ou *TP53^{R273H}*.

Les différentes constructions du vecteur pGL4.10 contenant le promoteur *P2RY6* sont listées dans les Tableaux 4 et 5. Après cinq heures de transfection, le milieu Extreme DMEM a été remplacé par du milieu DMEM complet. Les cellules sont lysées après 48h à l'aide du tampon de lyse PLB (Promega). L'activité luciférase est mesurée grâce aux systèmes Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) et Orion Microplate Luminometer (Titertek-Berthold, Pforzheim, Allemagne). L'efficacité de transfection a été normalisée par rapport à l'expression du gène *Renilla luciferase*.

Immunobuvardage.

L'expression de p53 a été analysée 48h après la co-transfection des cellules HCT 116. Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon Laemli et 20 μ g de protéines ont été chargées sur un gel d'acrylamide 10% puis transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidene difluoride). L'immunobuvardage a été effectué avec un anticorps anti-p53 (1C12, Cell Signaling Technology) dilué 1/10 000 et un anticorps monoclonal anti-GAPDH de lapin (14C10, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, États-Unis) dilué 1/100 000.

Les expressions de p42/44, P-p42/44 et pCREB ont été analysées à partir de lysats de cellules HEK-293 surexprimant les constructions pIRESpuro-P2RY6-1, pIRESpuro-P2RY6-2 ou le vecteur vide (contrôle). La lyse et l'immunobuvardage sont réalisés de la même façon avec les anticorps suivants :

- p44/42 MAPK (ERK1/2) Rabbit Ab (Cell Signaling Technology), dilué 1/2000, pour la détection de p42/44 ;
- Monoclonal Anti-MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated ERK-1&2) (Sigma-Aldrich), dilué 1/3000 pour la détection de P-p42/44 ;
- Phospho-CREB (Ser133) (87G3) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology), dilué 1/1 000 pour pCREB.

Les anticorps primaires sont reconnus par des anticorps secondaires couplés HRP (ECL anti-mouse ou anti-rabbit IgG Horseradish, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, États-Unis) dilué 1/10 000 ou couplé à la phosphatase alcaline (anti-mouse ou anti-rabbit IgG AP Conjugate, Promega) dilué 1/10 000.

Les bandes de protéines ont été visualisées sur des films autoradiographiques HyBlot ES (Denville Scientific Inc., Holliston, MA, États-Unis). Les signaux ont été normalisés par des analyses de densitométrie.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Les cellules HCT 116 et HT-29 confluentes ont été fixées avec une solution de formaldéhyde 1,1%, pendant 10 minutes à température pièce. La réaction est arrêtée par une solution de glycine à une concentration finale de 125 mM, pendant cinq minutes à température pièce. La chromatine est ensuite soniquée 15 fois, pendant dix secondes avec une pause de trois minutes sur glace entre chaque sonication. La chromatine est immunoprécipitée avec 4 µg d'anticorps anti-ARN polymérase II (CTD4H8, EMD Milipore, Darmstadt, Germany), 4 µg d'anticorps anti-p53 (1C12, Cell Signaling Technology) ou 4 µg du contrôle IgG (G3A1, Cell Signaling Technology). L'ADN immunoprécipité a été amplifié par PCR quantitative en utilisant le réactif Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies Santa Clara, CA, États-Unis) et le Rotor-Gene 6000 Series (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis). Les amorces utilisées sont listées ci-dessous :

- promoteur de p21 : 5'-CTGTCCTCCCCGAGGTCA-3'; 5'-ACATCTCAGGCTGCTCAGAGTCT-3'

- promoteur de GAPDH : 5'-GTCACTACCGCAGAGCCTC-3'; 5'-GGACCCTTACACGCTTGGAT-3'
- région promotrice 1 de *P2RY6* : 5'-ACTAGGTACCGCAGGTAAGGGCGTGCG-3'; 5'-ACTACTCGAGTACACACATATGCAGGGACTC-3'
- région promotrice 4 de *P2RY6* : 5'-ACTAGGTACCAAACAGCCACCCAATGCGTG-3'; 5'-ACTACTCGAGGTCGCGTGCAATGTTCTGGC-3'

La capacité de la liaison des facteurs de transcription au promoteur de *P2RY6* a été calculée selon les formules mathématiques $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak & Schmittgen 2001).

Essais AlphaScreen SureFire

Les deux isoformes de *P2Y₆* ont été préalablement clonées dans le vecteur pLenti Adaptator avec les amorces suivantes, élaborées à partir de la position de l'ATG afin d'être chacune spécifique à une isoforme :

- isoforme 1 : 5'-ACTAGATATCGCCACCATGAGTCAGCATTGGTGTAAGG-3' ; 5'-ACTACTCGAGTCAGCGACCCTGCCTCTG-3'
- isoforme 2 : 5'-ACTAGATATCGCCACCATGGAATGGGACAATG-3' ; 5'-ACTACTCGAGTCAGCGACCCTGCCTCTG-3'

Le vecteur pLenti Adaptator contenant les inserts d'intérêt a ensuite été digéré via l'enzyme de restriction XbaI (New England BioLabs). Le vecteur pIRESpuro a été ouvert avec l'enzyme NheI (New England BioLabs). Il s'en suit la ligation de l'insert dans le vecteur pIRESpuro. L'orientation de l'insert a été vérifiée et validée par séquençage.

Les cellules HEK-293 surexprimant les constructions pIRES-P2RY6-1, pIRES-P2RY6-2 ou le vecteur vide (contrôle) sont ensemencées à une quantité de 40 000 cellules par puits dans une plaque à 96 puits dans 100 μ L milieu de culture DMEN (Wisent). 24h après le milieu de culture complet est retiré, les cellules sont rincées au PBS 1X et 72 μ L de milieu DMEN (Wisent) sans serum ni rouge de phénol est ajouté. Les cellules sont incubées 18h à 37°C. Le jour suivant, les cellules sont stimulées avec 8 μ L d'UDP à différentes concentrations, pendant 10 minutes à 37°C. 20 μ L de tampon de lyse sont ajoutés et les cellules sont congelées pour au moins 16h avant de procéder à l'essai

AlphaScreen SureFire. L'essai est réalisé en utilisant le kit AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis) selon les instructions du fabricant. Deux anticorps sont utilisés. L'un va être reconnu par des billes donneuses recouvertes de streptavidine et l'autre va être capturé par des billes accepteuses émettant un signal lumineux et recouvertes de protéine A. En présence d'une protéine phosphorylée, les deux anticorps rapprochent les billes donneuses et accepteuses. Les billes de streptavidine vont exciter les billes de protéine A, émettant alors un signal lumineux à une longueur d'onde différente du signal émis initialement. La quantité d'émission de lumière est directement proportionnelle à la quantité de phosphoprotéine présente dans l'échantillon.

RÉSULTATS

L'objectif principal des travaux est de caractériser les mécanismes moléculaires liés à p53 régulant l'expression du gène *P2RY6* dans le cancer colorectal. Pour cela, il est nécessaire dans un premier temps de déterminer et caractériser les régions promotrices du gène *P2RY6* dans les cellules épithéliales intestinales cancéreuses et dans un second temps, d'étudier l'effet de p53 (mutante *versus* forme sauvage) sur l'expression du récepteur P2Y₆.

Déterminer et caractériser les régions promotrices du gène P2RY6 dans les cellules épithéliales intestinales cancéreuses.

Comme mentionné dans l'introduction, le gène humain *P2RY6* code pour 8 variants d'ARNm : 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 et 9. Tous les variants, excepté le variant 9, codent pour l'isoforme 1 du récepteur P2Y₆, forme connue et caractérisée du récepteur. Le variant 9, avec un exon de moins, code pour l'isoforme 2 possédant une région N-terminale plus longue que l'isoforme 1 et dont la fonction reste à déterminer. Selon la base de données NCBI, les huit variants d'ARNm semblent être associés à quatre sites d'initiation de la transcription différents : les variants 1, 3, 6 et 8 seraient associés à une région que nous nommerons région 1 (R1) ; le variant 7 à la région 2 (R2) ; le variant 2 à la région 3 (R3) et enfin, les variants 5 et 9 correspondraient à la région 4 (R4). Une expérience de *primer extension 5' RACE* a été effectuée sur les variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6* afin de déterminer les sites d'initiation de la transcription qui leur sont associés. En effet, la région 4 est la plus éloignée de la région 1 qui contient le site d'initiation de la transcription connu pour *P2RY6*. Ainsi, si l'expérience révèle un site d'initiation différent, nous pourrions supposer l'existence d'une autre région promotrice potentielle et ainsi différencier des variants issus de différents sites d'initiation de la transcription de variants d'épissage. Après avoir synthétisé un ADN complémentaire aux brins d'ARN purifiés, une queue poly(A) y est ajoutée, suivie d'une première amplification par PCR (PCR I). La première amorce utilisée est complémentaire à la queue poly(A) et contient une séquence supplémentaire qui servira d'adaptateur pour une seconde amorce lors de la deuxième amplification. La

deuxième amorce correspond à une région de *P2RY6* commune à tous les variants d'ARNm. Une deuxième réaction de PCR (PCR II) est exécutée avec une deuxième paire d'amorces. Ainsi, n'est sélectionné que l'ADN complémentaire aux deux paires d'amorces et l'amplification non spécifique est diminuée de façon importante. La première amorce utilisée est complémentaire à l'adaptateur ajouté lors de la première amplification. La seconde amorce est spécifique au variant 5 ou au variant 9 d'ARNm de *P2RY6*. Le protocole est résumé sur la Figure 21. Les produits des PCR I et II ont été chargés sur gel d'agarose et sont présentés sur la Figure 22. Par la suite, afin de valider la présence des différents variants d'ARNm de *P2RY6* dans nos échantillons, une troisième amplification PCR (PCR III) a été faite avec de nouvelles amorces complémentaires aux variants 5 et 9 respectivement. Ces produits finaux ont été chargés sur gel d'agarose, comme le montre la Figure 22.

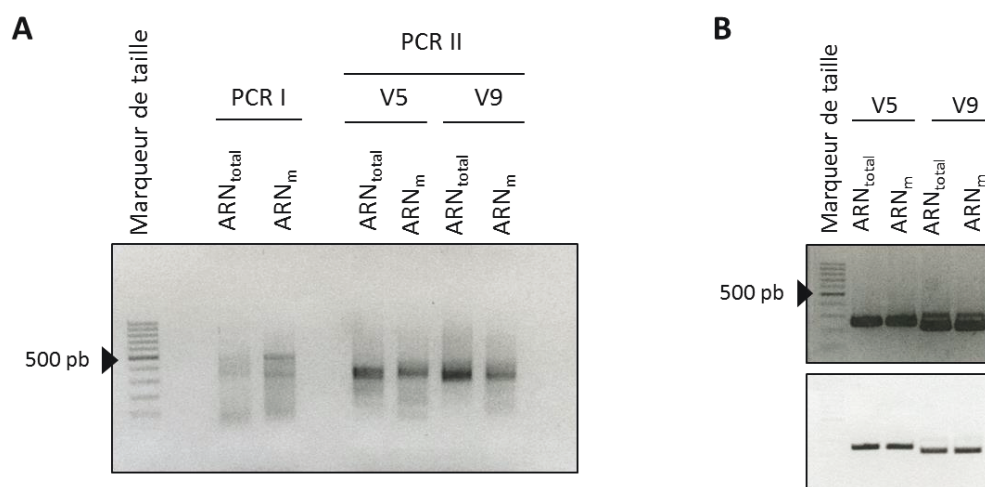


Figure 22 : Validation des produits de PCR lors de l'expérience 5'RACE. A) Les deux réactions PCR I ont été effectuées à partir de l'ADN complémentaire obtenu de l'ARN total ou de l'ARNm purifié de cellules Caco-2 confluentes. Les réactions PCR II ont été effectuées de façon sélective pour le variant V5 ou V9. Les produits ont ensuite été clonés afin de déterminer le site d'initiation de la transcription. **B)** À partir des produits de PCR II présentés en A), la réaction de PCR III a été effectuée afin de valider la présence des fragments V5 et V9 dans nos échantillons pour pouvoir procéder au clonage.

Le panneau A de la Figure 22 nous montre les produits des PCR I, effectuée à partir de l'ADN complémentaire obtenu à partir de l'ARN total ou de l'ARNm purifié de cellules

Caco-2 confluentes, ainsi que les produits de PCR II, effectuée à partir des produits de la première réaction de PCR. Il est normal d'observer sur le gel des produits d'amplification non spécifique suite à la réaction de PCR I car comme mentionné précédemment, la deuxième amplification permet de diminuer le nombre de transcrits non spécifiques. C'est bien ce que nous observons : la réaction de PCR II permet une meilleure sélection et de visualiser des fragments pouvant correspondre aux variants 5 et 9. C'est donc pour valider la présence de nos fragments d'intérêt qu'une troisième amplification par PCR a été effectuée, à partir des produits de la PCR II, comme présenté sur le panneau B de la Figure 22. Les deux photographies présentées sont deux images du même gel, l'exposition étant plus forte sur l'une d'elles afin de visualiser le marqueur de taille. Les bandes obtenues correspondent au variant V5 de 250 pb et au variant V9 de 219 pb. Notons qu'il est normal que les bandes soient situées plus haut dans le gel du panneau A, car les produits d'ADN présentés ici contiennent une séquence ajoutée par les amorces utilisées lors de l'expérience. Les amorces utilisées lors de la troisième amplification ciblent une plus petite région. La présence des variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6* ayant été confirmée, nous pouvons maintenant procéder au clonage. L'ADN a été extrait des bactéries sélectionnées à la kanamycine et une nouvelle réaction de PCR similaire à la PCR III a été effectuée afin de ne conserver que les clones positifs pour les variants 5 ou 9. Sur 48 clones testés, 24 ont été envoyés à séquencer et 13 ont donné des résultats analysables comme présentés sur la Figure 23.



Figure 23 : Détermination des sites d'initiation de la transcription des variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6* suite à l'expérience de 5'RACE. La séquence d'ADN génomique de *P2RY6* est représentée en noir. En vert foncé est représentée la région d'ADN correspondant au premier exon des variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6*. L'ATG en rouge correspond à l'ATG théorique du variant 9 permettant de coder pour l'isoforme 2 du récepteur P2Y₆. En orange sont représentés les sites d'initiation de la transcription (+1) déterminés après clonage et séquençage de la région 5'UTR du variant 5. Les sites d'initiation de la transcription (+1) déterminés après clonage et séquençage de la région 5'UTR du variant 9 sont en gris. Cependant, ils se retrouvent tous après l'ATG. Le seul +1 du variant 9 se situant en amont de l'ATG est présenté en vert clair.

L'expérience de 5'RACE a permis de cloner la région 5'UTR des variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6*. Le séquençage a permis de déterminer le nucléotide +1. Plusieurs résultats ont été obtenus comme le montre la Figure 23. La figure permet d'aligner la séquence d'ADN génomique de *P2RY6* (en noir) avec la séquence du premier exon de ses variants d'ARNm V5 et V9 (en vert foncé). Rappelons que le variant 9 possède un exon de plus que le variant 5 et un ATG différent, représenté en rouge sur la Figure 23. L'ATG du variant 5 n'est pas représenté ici, car se situe dans une région plus éloignée. Les +1 du variant 5 déterminés après analyses des séquences obtenues sont représentés par les rectangles oranges. Il est intéressant de noter qu'ils se situent tous dans une zone assez restreinte, ce qui suggère qu'effectivement, la transcription peut démarrer dans cette région. Les rectangles gris correspondent aux +1 obtenus avec le variant 9 se situant après l'ATG, mais un clone nous a permis d'identifier un nucléotide +1 situé en amont de l'ATG supportant une traduction possible de l'isoforme 2 du récepteur P2Y₆. Il est possible que les décalages entre les différents nucléotides identifiés soient dus à des erreurs de séquençage. Cependant, la figure met en évidence une région d'ADN restreinte dans laquelle l'initiation de la transcription est possible. Ainsi, cela semble confirmer la présence de nucléotides +1 alternatifs, associés à une autre région promotrice de *P2RY6*.

En résumé, nous avons été capables d'identifier des sites d'initiation de la transcription différents du +1 connu et ainsi l'existence d'une autre région promotrice potentielle de *P2RY6*. Cela semble confirmer, que les variants d'ARNm V5 et V9 seraient associés à la région promotrice R4 de *P2RY6*. Il est donc probable, comme mentionné précédemment que les variants 1, 3, 6 et 8 soient associés à la R1 ; le variant 7 à la région R2 et le variant 2 à la région R3. La présence de ces quatre régions a le potentiel de donner un profil d'expression des variants différent d'une lignée cellulaire à l'autre. L'expérience de 5'RACE ayant été effectuée à partir de l'ARN de cellules Caco-2, une quantification par qPCR des différents variant d'ARNm de *P2RY6* a été exécutée à partir de trois lignées cellulaires différentes.

Des qPCR ont été réalisées dans trois lignées cellulaires cancéreuses colorectales : les HCT 116, les HT-29 et les Caco-2 (Figure 24). Rappelons que ces cellules expriment des formes de p53 différentes, comme décrit dans le Tableau 2.

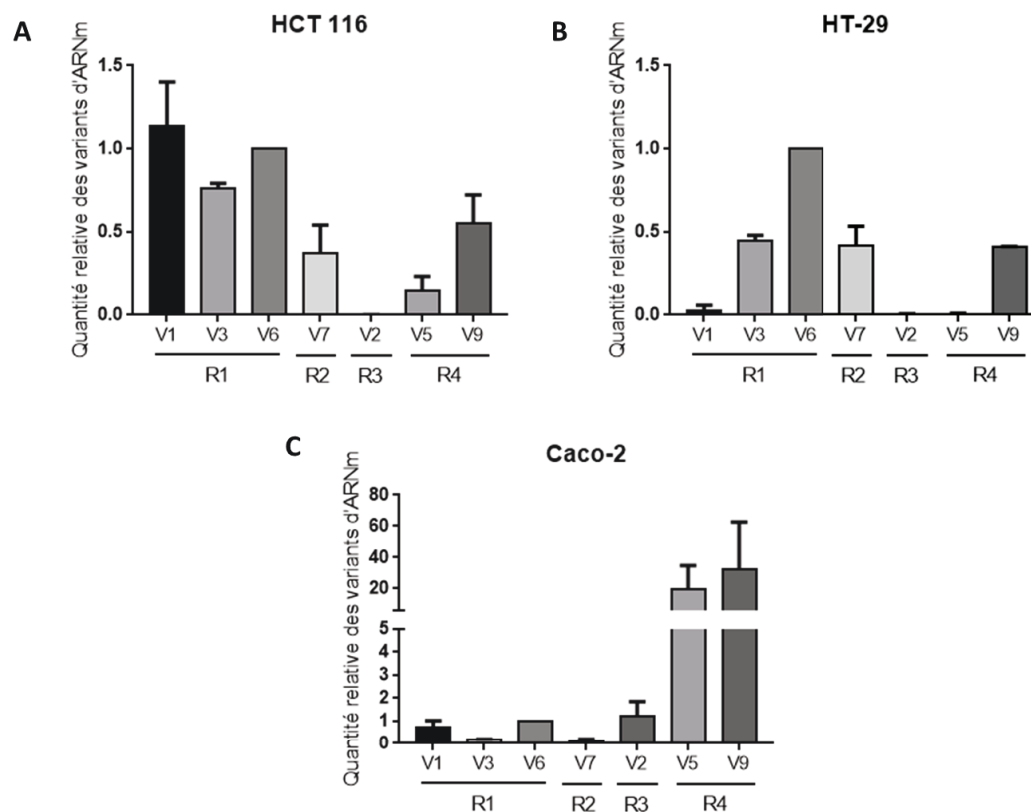


Figure 24 : Quantification des variants 1 (V1), 3 (V3), 6 (V6), 7 (V7), 2 (V2), 5 (V5) et 9 (V9) d'ARNm de *P2RY6*, correspondant aux quatre régions promotrices potentielles (R1, R2, R3 et R4) définies précédemment, dans les cellules A) HCT 116 ; B) HT-29 et C) Caco-2. Analyse réalisée par qPCR. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la quantité de variant 6 présent, égale à 1. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne \pm SEM (n=1 en duplicatas). La significativité statistique fut déterminé par un test one-way ANOVA, où * : p<0,05.

La Figure 24 montre que les trois lignées cellulaires étudiées présentent des profils d'expression de variants d'ARNm différents. Les variants 1, 3 et 6 semblent être les plus présents dans les cellules HCT 116. Le variant 6 serait le variant majoritaire dans les cellules HT-29 tandis que les variants 5 et 9 sont présents de façon importante dans les cellules Caco-2 confluentes. Les variants 1, 3 et 6 sont tous les deux associés à la région 1 du promoteur de *P2RY6* et les variants 5 et 9 sont associés à la région 4. De façon

intéressante, dans les trois lignées, le variant 9 est présent en plus grande quantité que le variant 5 et comme je l'ai préalablement fait remarquer, le variant 9 code pour une isoforme méconnue du récepteur P2Y₆. Notons que le variant 8 n'est pas présenté, car nous n'avons pas été en mesure de le détecter. Des profils d'expression si différents selon les lignées cellulaires suggèrent que la transcription et la génération de certains variants est un processus bien régulé. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à la régulation de la transcription du gène *P2RY6*, notamment par p53, muté dans plus de 50% des cancers et muté de façon précoce dans le cancer colorectal associé à la colite (Munro *et al.* 2005; Soong *et al.* 2000; Naccarati *et al.* 2012).

C'est dans la région promotrice d'un gène que se trouvent les éléments nécessaires à l'initiation de la transcription et les séquences *consensus* d'ADN permettant la liaison de facteurs de transcription précis. Nous nous sommes assurés de la présence de sites de liaison potentiels de p53 dans les quatre régions précédemment nommées R1, R2, R3 et R4, grâce à l'outil PROMO de Alggen (<http://alggen.lsi.upc.es>). Puis, nous avons cloné ces quatre régions d'ADN génomique dans le vecteur pGL4.10[*luc2*], en amont du gène *luc2* (*Photinus pyralis*) afin de tester leur potentiel d'activation par essais luciférase. En parallèle, nous nous sommes procuré trois constructions de *TP53*, clonées dans le vecteur pCMV-Neo-Bam : *TP53*^{WT} codant pour la forme sauvage de p53 (p53^{WT}), *TP53*^{V143A} codant pour la protéine mutante p53^{V143A} et *TP53*^{R273H} codant pour la protéine mutante p53^{R273H}. Ces différentes constructions ont alors été transfectées à l'aide de l'agent de transfection XtremeGENETM, dans les cellules HCT 116 comme nous l'avons précédemment décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les combinaisons utilisées pour les co-transfections sont illustrées à la Figure 25 qui nous présente les activités luciférase relatives des différentes régions promotrices en réponse à l'expression ou non de p53^{WT}, p53^{V143A} et de p53^{R273H}. L'expérience a été réalisée deux fois.

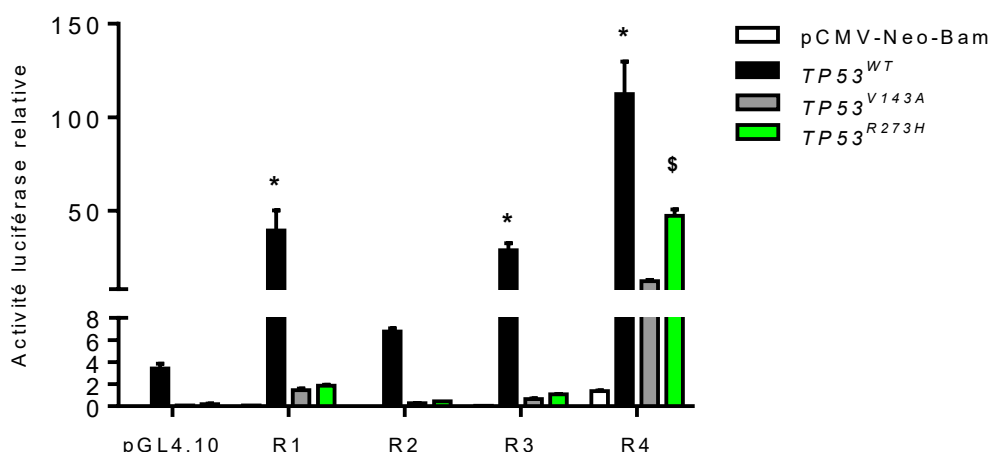


Figure 25 : Activité transcriptionnelle des quatre régions d'activation potentielle du gène humain *P2RY6*. Des cellules HCT 116, à 80% de confluence, ont été co-transfectées avec 0,1µg d'une des constructions du promoteur de *P2RY6* ou du vecteur pGL4.10[*luc2*] vide (contrôle) ; 0,1µg d'une des constructions de *TP53* ou du vecteur vide pCMV-Neo-Bam (contrôle) et 1 ng de la construction *Renilla luciferase*. L'intensité lumineuse produite par l'expression du gène *luc2* a été mesurée 48h après la transfection et l'efficacité de la transfection a été normalisée en fonction de l'expression de *Renilla luciferase*. L'activité luciférase relative est exprimée en unités lumineuses relatives à pGL4.10[*luc2*]. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SEM (n = 2 en dupliqua). La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un test two-way ANOVA, où * : p < 0,05.

La transcription de la région 1 semble être activée par la protéine p53^{WT}, comparativement aux contrôles vecteurs vides : pCMV-Neo-Bam et pGL4.10[*luc2*]. Ce résultat correspond à ce que nous attendions, car s'il y a activation de la transcription, la région la plus susceptible d'être activée est bien la région 1, région promotrice connue du gène *P2RY6*. La région 3 présente un profil similaire. Pour ce qui est de la région 4, elle semble être activée à la fois par p53^{WT} et p53^{R273H}, comparativement aux contrôles. Cependant, pour une même quantité d'ADN transfecté, l'activation transcriptionnelle induite par p53^{R273H} est moins importante que celle due à p53^{WT}. Finalement, la région 2 et présente une transactivation moins importante. À la lumière de ces résultats, nous avons donc concentré nos efforts de caractérisation sur la région 1, car elle est associée à quatre variants d'ARNm (V1, V3, V6 et V8) et la région 4 puisqu'elle semble être activée par la forme mutante p53^{R273H}. Malgré une légère activité luciférase observée avec la région 3, nous ne l'avons pas sélectionnée, car selon les profils d'expression de variants présentés à

la Figure 24, le variant 2 associé est très peu exprimé dans les lignées cellulaires étudiées. Enfin, la protéine mutante $p53^{V143A}$ ne présente qu'une faible activité transcriptionnelle. Ce faible potentiel de transactivation pourrait être associé au fait que $p53^{V143A}$ est un mutant instable de p53 (Joerger et Fersht, 2007). Il est rapidement dégradé ce qui l'empêche de jouer son rôle de facteur de transcription. Nous avons donc poursuivi nos travaux de caractérisation avec les protéines $p53^{WT}$ et $p53^{R273H}$. Cependant, nous désirions valider que l'activation de la transcription observée était bien due aux constructions transfectées. Nous avons réalisé une courbe dose-réponse, de l'activité transcriptionnelle de *P2RY6* en réponse à l'expression de p53 normale ou mutée. Pour ce faire, des cellules HCT 116 ont été co-transfectées avec la construction R1 de 1935 pb ou la construction R4 de 2218 pb ; une quantité croissante de $TP53^{WT}$, $TP53^{V143A}$ ou $TP53^{R273H}$ et la construction *Renilla luciferase*. La Figure 26 présente les résultats combinés de trois expériences indépendantes.

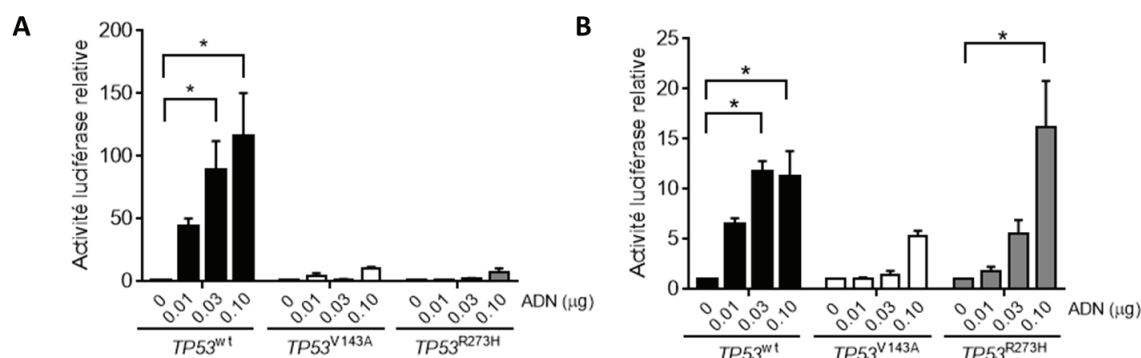


Figure 26 : L'activité transcriptionnelle des régions 1 et 4 augmente lorsque l'on augmente la quantité de $TP53^{WT}$ ou $TP53^{R273H}$. A) Des cellules HCT 116, à 80% de confluence, ont été co-transfectées avec des quantités croissantes des constructions de $TP53^{WT}$, $TP53^{V143A}$ et $TP53^{R273H}$; 1 ng du plasmide exprimant le gène *Renilla luciferase* et A) 0,1 μg de la construction R1 de 1935 pb ou du vecteur pGL4.10[*luc2*] (contrôle, non montré) ; B) 0,1 μg de la construction R4 de 2218 pb ou du vecteur pGL4.10[*luc2*] (contrôle, non montré). L'intensité lumineuse produite par l'expression du gène *luc2* a été mesurée 48h après la transfection et l'efficacité de la transfection a été normalisée en fonction de l'expression de *Renilla luciferase*. L'activité luciférase relative est exprimée en unités lumineuses relatives à pGL4.10[*luc2*]. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SEM (n = 3 en duplicatas). La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un test two-way ANOVA, où * : p < 0,05.

Les résultats obtenus sont cohérents avec les résultats présentés à la Figure 25. Le panneau A de la Figure 26 représente l'activité transcriptionnelle de la région 1. Encore une

fois, seul *TP53^{WT}* semble activer la transcription. Une augmentation d'activité est observée dès que l'on transfecte 0,01 µg du plasmide exprimant la forme sauvage de *TP53*. L'activité transcriptionnelle de la région 4 est présentée à la Figure 26B. La forme sauvage de p53 semble activer la transcription de la région R4 même lorsque de faibles quantités d'ADN (0.01 µg) est co-transfecté avec la construction luciférase R4. Contrairement à *TP53^{WT}*, une quantité plus importante de *TP53^{R273H}* est nécessaire afin d'observer un effet transcriptionnel significatif. En effet, il faut transfecter 0,10 µg du plasmide exprimant *TP53^{R273H}* pour obtenir une induction significative de la transcription de la région promotrice 4 (R4). Encore une fois, le mutant V143A ne montre pas ou peu d'effet.

Afin de cibler plus précisément le site liaison de p53, nous avons généré des constructions des régions 1 et 4 de tailles différentes (Tableaux 4 et 5). Ces différentes constructions ont été générées par des digestions enzymatiques ou par sous-clonages de la région promotrice entière comme décrit à la section Matériels et Méthodes. Des essais luciférase ont été effectués avec des cellules HCT 116 cotransfectées avec les différentes constructions du promoteur de *P2RY6* générées et la forme sauvage ou mutante R273H de *TP53*, ou les vecteurs vides comme contrôles. La Figure 27 présente les résultats représentatifs d'une expérience répétée quatre fois.

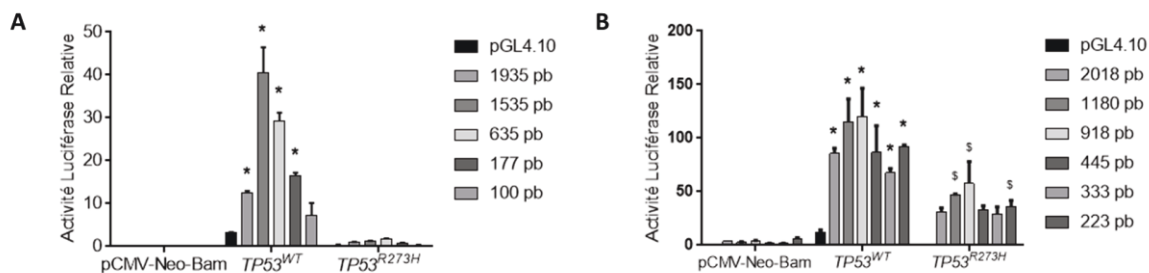


Figure 27 : Activité transcriptionnelle des régions 1 et 4 du promoteur de *P2RY6* en réponse à l'expression de p53 normale ou de sa forme mutante p53^{R273H}. Des cellules HCT 116, à 80% de confluence, ont été cotransfectées avec 0,1µg d'une des constructions de *TP53* ou du vecteur vide pCMV-Neo-Bam (contrôle) ; 1 ng de la construction *Renilla luciferase* et **A**) 0,1µg des différentes constructions R1-pGL4.10[*luc2*] (tailles indiquées) ou du vecteur pGL4.10 vide (contrôle) ; **B**) 0,1µg des différentes constructions R4-pGL4.10[*luc2*] (tailles indiquées) ou du vecteur pGL4.10[*luc2*] vide (contrôle). L'intensité lumineuse produite par l'expression du gène *luc2* a été mesurée 48h après la transfection et l'efficacité de la transfection a été normalisée en fonction de l'expression de *Renilla luciferase*. L'activité luciférase relative est exprimée en unités lumineuses relatives à pGL4.10[*luc2*]. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SEM (n = 4 en dupliqua). La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un test two-way ANOVA, où * : p < 0,05.

Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus. En effet, la transcription des constructions R1 n'est induite que par p53^{WT} et la transcription des constructions R4 est induite par les deux formes de p53 : p53^{WT} et p53^{R273H}. La Figure 27A semble montrer une activation plus importante des constructions de 1535 pb et 635 pb, comparativement aux constructions plus longues et plus courtes. La Figure 27B montre que l'induction de la transcription de la région 4 par p53^{WT} est plus importante que celle de p53^{R273H}, comme l'avaient suggéré les résultats précédents. On observe les mêmes tendances que dans le graphique de la Figure 27A : les constructions de 1180 et 918 pb semblent présenter une activation légèrement plus importante que la construction plus longue ou les constructions plus courtes.

Dans tous les essais réalisés, l'effet de p53^{R273H} sur la transcription est moins marqué que celui de p53^{WT}. Des immunobuvardages ont donc été réalisés afin de vérifier si les cellules exprimaient p53 de façon équivalente ou si les différences d'effets observées étaient dues à des différences de niveaux d'expression de p53. Des cellules HCT 116 ont été co-transfectées de la même manière que précédemment, mais 48h après la transfection,

la lyse des cellules a été effectuée à l'aide d'une solution de Laemmli afin de procéder à l'immunobuvardage, présenté à la Figure 28.

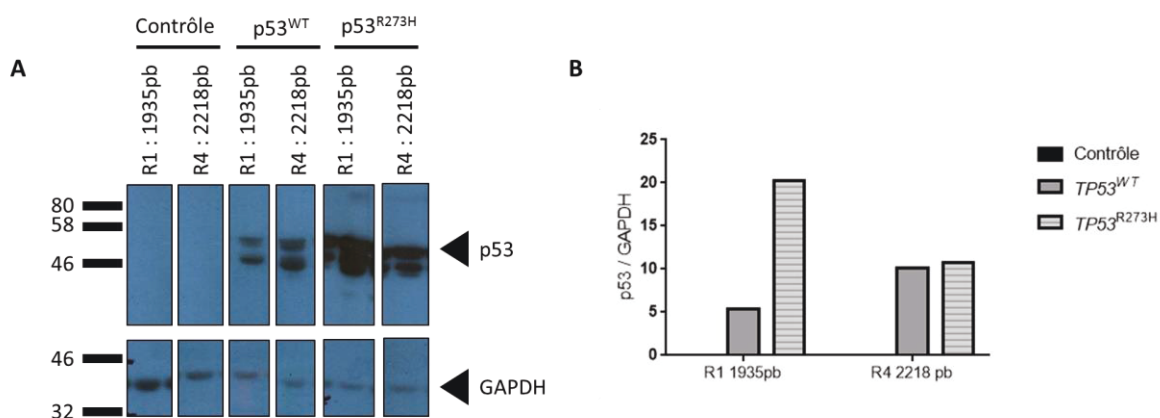


Figure 28 : Niveaux d'expression des protéines p53 exogènes dans des cellules HCT116 transfectées. Des cellules HCT 116 à 80% de confluence, ont été transfectées avec 0,1 μ g de la construction R1-pGL4.10[luc2] de 1 935 pb ou R4-pGL4.10[luc2] de 2 218 pb ou le vecteur pGL4.10[luc2] vide et 0,1 μ g d'une des constructions de $TP53$ ou du vecteur vide pCMV-Neo-Bam (contrôle). 48h après la transfection, les cellules ont été lysées au Laemmli. Les protéines dosées ont été analysées par immunobuvardage de type Western. **A)** Immunobuvardage de type Western réalisé à partir de lysats de HCT 116 cotransfectée avec différentes constructions. **B)** Analyse densitométrique des résultats présentés dans le panneau A. L'expression de la GAPDH fut utilisée comme marqueur d'intégrité et de contrôle de chargement.

La Figure 28 nous montre que pour une même quantité d'ADN transfecté la protéine mutante $p53^{R273H}$ est exprimée de façon plus importante que la forme sauvage. Pour ces expériences, nous n'avons pas été en mesure de détecter la forme endogène de p53 dans les cellules transfectées avec le vecteur vide. Cependant, en allongeant les temps d'exposition, la protéine p53 endogène peut être détectée (non montré). Nous avons validé nos observations par une analyse densitométrique. Nous observons une expression importante de $p53^{R273H}$ comparativement à $p53^{WT}$ et au vecteur vide. Ainsi, les différences de transactivation mesurées lors des essais luciférase ne sont pas dues à une expression plus faible la protéine mutante. Il est possible que l'affinité de $p53^{R273H}$ soit modifiée à cause de sa mutation dans son domaine de liaison à l'ADN ou que la forme mutante se lie à d'autres cibles dans l'ADN que $p53^{WT}$.

Il a été montré que, malgré sa mutation dans son domaine de liaison à l'ADN, p53^{R273H} gardait sa capacité de liaison à l'ADN et qu'il est capable d'activer des gènes non régulés par la protéine normale comme, entre autres, c-Myc (Frazier et al. 1998), le récepteur à l'EGF (Ludes-Meyers et al. 1996) ou encore l'IGF2 (Lee et al. 2000). Il y a bien une activation différentielle des deux formes de p53 étudiées. De plus, les séquences *consensus* dans les promoteurs auxquelles se lient les facteurs de transcription afin de réguler l'expression des gènes cibles peut varier légèrement d'un promoteur à l'autre (Nikulenkov et al. 2012). Ainsi, le mutant R273H, qui présente une mutation dans son domaine de liaison à l'ADN, est toujours capable de lier l'ADN, mais il est possible que son affinité pour certaines séquences soit réduite. Nous avons effectué des essais luciférase supplémentaires afin de vérifier si le mutant R273H n'avait donc pas une influence négative sur l'expression de *P2RY6*. Comme mentionné précédemment, la protéine p53 se lie à l'ADN sous forme d'un tétramère. Dans le cas d'une cellule où p53 est mutée, le tétramère va être formé à la fois de la protéine de type sauvage et de la protéine mutante (Chan *et al.* 2004). Nous avons donc réalisé un nouvel essai luciférase afin de vérifier si les deux formes de p53 étudiées entraient en compétition pour se lier au promoteur de *P2RY6*.

Étudier l'effet de p53 (mutante versus forme sauvage) sur l'expression du récepteur P2Y₆.

Des cellules HCT 116 ont été cotransfectées avec une quantité constante de la construction *TP53^{WT}* et une quantité croissante de *TP53^{R273H}*. La Figure 29 présente les résultats combinés de trois expériences indépendantes.

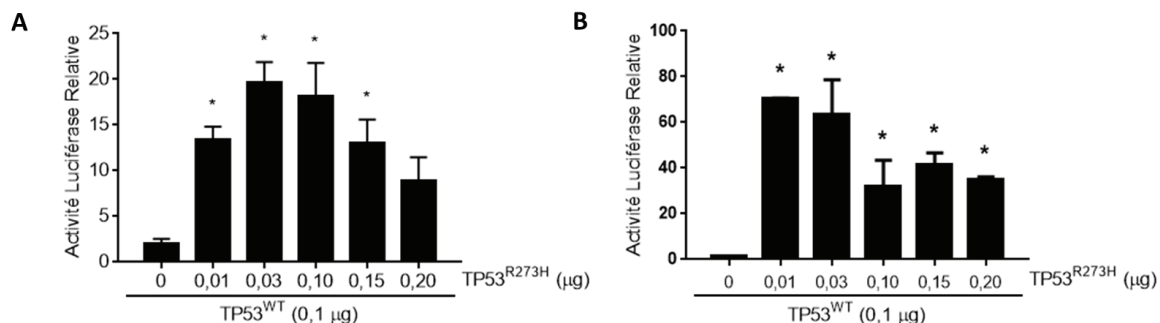


Figure 29 : Compétition des formes p53^{WT} et p53^{R273H} pour se lier au promoteur de *P2RY6*. Des cellules HCT 116, à 80% de confluence, ont été transfectées avec 0,1 µg de *TP53^{WT}* ; une quantité croissante de *TP53^{R273H}* (de 0 à 0,2 µg) ; 1 ng de la construction *Renilla luciferase* et **A)** 0,1 µg de la construction R1-pGL4.10 de 1535 pb ou **B)** 0,1µg de la construction R4-pGL4.10 de 918 pb. Les quantités d'ADN transfectées ont toutes été ajustées à 0,3 µg, en ajoutant du vecteur pCMV-Neo-Bam lorsque nécessaire. L'intensité lumineuse produite par l'expression du gène *luc2* a été mesurée 48h après la transfection et l'efficacité de la transfection a été normalisée en fonction de l'expression de *Renilla luciferase*. L'activité luciférase relative est exprimée en unités lumineuses relatives à pGL4.10[*luc2*]. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SEM (n = 3 en dupliqua). La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un test one-way ANOVA, où * : p < 0,05.

Le panneau A de la Figure 29 montre que p53^{WT} seul active la transcription de la région 1 du promoteur de *P2RY6*, en accord avec ce qui a été vu précédemment. Lorsque l'on augmente la quantité de p53^{R273H}, on perd progressivement l'activation. Cela suggère qu'il pourrait bien y avoir une compétition entre les différentes formes de p53 pour former un tétramère et réguler l'expression des gènes. Ainsi, le mutant R273H, qui ne se lie pas à la région 1 du promoteur de *P2RY6* est capable de diminuer l'induction de sa transcription. Au contraire, le panneau B nous montre que l'activation de la région 4 est maintenue. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation par p53^{R273H} est moins importante que celle induite par p53^{WT}. Cependant, lorsque la quantité de p53^{R273H} est augmentée, l'activation induite par p53^{WT} perd en intensité, mais est tout de même conservée. Ces résultats suggèrent une régulation différentielle de *P2RY6* selon la forme de p53 exprimée. La forme mutante, ne liant pas la région 1 du promoteur, est susceptible de diminuer l'activation transcriptionnelle du gène ou, au contraire, de la conserver en régulant la région 4. Rappelons que la région 4 est associée aux variants d'ARN messagers 5 et 9 et que le variant 9 code pour l'isoforme 2 non caractérisée du récepteur P2Y₆. Une activation de

cette région promotrice plutôt qu'une autre pourrait entraîner un changement de profil d'expression des isoformes du récepteur P2Y₆ dans les cellules.

Ces différents essais ont été réalisés dans des cellules surexprimant différentes constructions exogènes du promoteur de *P2RY6* et de *TP53*. Ainsi, ils ne prennent pas en compte les marques épigénétiques affectant la chromatine. Des immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) ont été réalisées afin de vérifier l'effet de p53 endogène sur l'expression de *P2RY6*. Les expériences ont été réalisées avec des cellules HCT 116 exprimant la protéine p53 de type sauvage et avec des cellules HT-29 exprimant le mutant d'intérêt p53^{R273H} de façon endogène. Les cellules ont été portées à une densité d'environ 10 millions de cellules par pétris de 10 cm puis fixées avec une solution de formaldéhyde 1,1%. Une fois les cellules lysées, la chromatine est réduite en fragments de moins de 500 pb par sonications. Les fragments de chromatine liés à p53 sont ensuite immunoprécipités puis amplifiés et quantifiés par une réaction de qPCR. Un anticorps anti-ARN polymérase II et un contrôle IgG sont utilisés respectivement comme contrôles positif et négatif d'IP. Des amorces complémentaires à une région du promoteur de la protéine p21 sont utilisées comme contrôles positifs d'amplification. En effet, p21 est une cible bien connue de p53 (Kaeser et Iggo, 2001). Des amorces complémentaires à une région du promoteur de la protéine GAPDH est utilisée comme contrôle négatif d'amplification (Kaeser et Iggo, 2001). La protéine ARN polymérase II devrait être liée au promoteur, mais pas p53. Enfin, les dernières amorces utilisées correspondent aux deux régions promotrices potentielles de *P2RY6* : R1 (100 pb) et R4 (223 pb). La Figure 30 présente les résultats représentatifs d'une expérience répétée quatre fois.

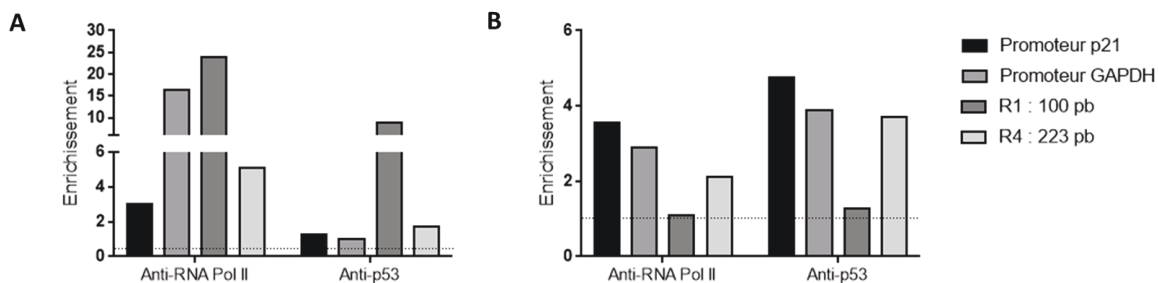


Figure 30 : Les ChIP permettent d'identifier les facteurs de transcription liés à une région d'ADN précise. Les cellules portées à une densité d'environ 10 millions de cellules par pétris de 10 cm sont fixées avec une solution de formaldéhyde 1,1%. Après lyse, la chromatine est réduite en fragments de moins de 500 pb. Trois IP sont réalisées : le contrôle positif ARN polymérase II, le contrôle négatif IgG et p53. L'ADN immunoprécipité est quantifié par qPCR. Les amorces utilisées correspondent aux promoteurs de p21, GAPDH et aux régions 1 et 4 de *P2RY6*. Les résultats sont exprimés en enrichissement par rapport au contrôle négatif IgG, égal à 1. **A)** Résultats obtenus avec les cellules HCT 116, exprimant la protéine p53 de type sauvage. **B)** Résultats obtenus avec les cellules HT-29, exprimant la protéine p53^{R273H}.

Dans les HCT 116 (Figure 30A), le promoteur de GAPDH est présent dans l'IP de l'ARN polymérase II, comparativement au contrôle IgG, mais pas dans l'échantillon p53, comme attendu. Le promoteur de p21 est enrichi dans l'IP de l'ARN polymérase II seulement. Cependant, nous supposons qu'un enrichissement plus important aurait pu être observé en stimulant préalablement l'expression de p53, en causant des dommages à l'ADN par des radiations ionisantes ou en les exposant à de hautes doses d'ultraviolets par exemple (Kaeser & Iggo 2002). La région 1 présente un enrichissement important dans l'IP de l'ARN polymérase II ainsi que dans celle de p53. Cela correspond aux résultats attendus. D'une part, il est normal que l'enrichissement soit plus important avec l'ARN polymérase II, car elle se fixe sur tous les promoteurs de gènes transcrits. Elle est alors présente sur la région 1 de *P2RY6* à chaque fois qu'il est transcrit même lorsqu'il n'est pas régulé par p53. L'enrichissement dans l'IP de p53 représente seulement la portion de promoteur où se fixe p53. D'autre part, nous avons montré par nos essais luciférase que p53^{WT} était capable de se lier à la région 1, ce qui semble être confirmé ici. La région 4 est enrichie dans l'IP de l'ARN polymérase II, mais pas dans l'IP de p53, ce qui suggère qu'elle est transcrite, mais non régulée par p53. Cela concorde également avec nos résultats précédents qui montraient que p53^{WT} ne se liait pas sur la région 4 de *P2RY6*. Le panneau B présente les résultats obtenus avec les cellules HT-29. Un enrichissement du promoteur de

p21 est observé dans les IP de l'ARN polymérase II ainsi que dans p53, comme attendu. Cependant, une quantité importante d'ADN correspondant au promoteur de GAPDH est également observée dans les deux IP. Or, cette région constitue un contrôle négatif de liaison de p53. Un résultat similaire a été décrit dans la littérature et s'expliquerait par la liaison non spécifique du groupement carboxyle en C-terminale de la protéine p53 sur le promoteur de GAPDH (Pavletich *et al.* 1993). De façon intéressante, la région 1 est peu enrichie alors que la région 4 est retrouvée en quantité plus importante. Ces résultats sont cohérents avec les résultats des essais luciférase puisque le mutant R273H, exprimés dans les HT-29, était capable d'induire la transcription de la région 4, mais pas de la région 1 du promoteur de *P2RY6*. Mis ensemble, les résultats suggèrent bien une régulation différentielle de *P2RY6* suivant la forme de p53 exprimée et les résultats obtenus au niveau endogène corroborent les résultats obtenus avec des constructions exogènes.

Le mutant R273H ne semble pas activer la région 1 du promoteur de *P2RY6*. Cependant, il a été montré qu'il pouvait réguler des gènes qui ne sont pas ciblés par la protéine normale. L'équipe de Frazier, en 1998, a identifié le gène *MYC*, codant pour le facteur de transcription c-Myc, comme un gène activé par le mutant p53^{R273H} (Frazier et al. 1998). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de c-Myc dans les lignées cellulaires HCT 116 invalidées pour p53 puis HCT 116 et HT-29 exprimant respectivement p53^{WT} et p53^{R273H}. L'expression de c-Fos, qui est aussi une cible transcriptionnelle de p53 a également été mesurée. Les résultats de l'immunobuvardage sont présentés sur la Figure 31A.

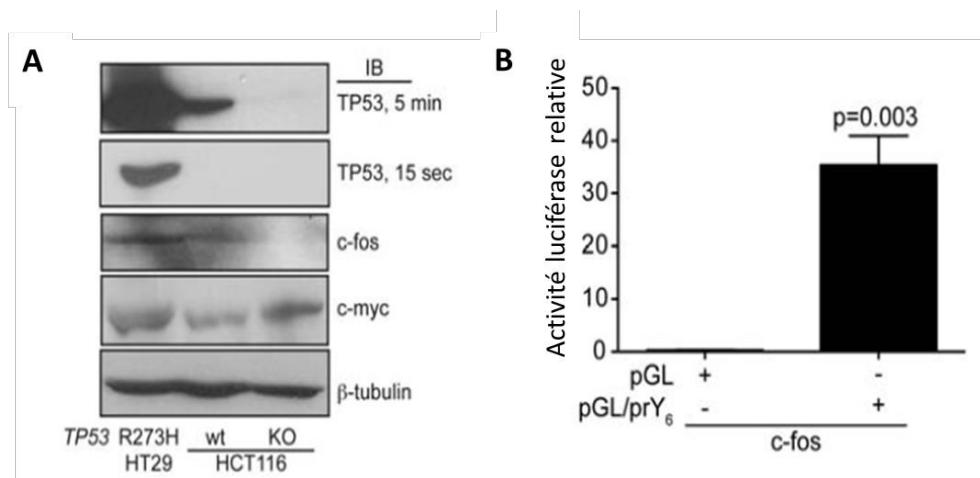


Figure 31 : La présence du mutant $TP53^{R273H}$ induit une augmentation de l'expression des facteurs de transcription c-Fos et c-Myc ce qui pourrait contribuer à la régulation de l'expression de $P2Y_6$. **A)** Par des analyses d'immunobuvardages, nous avons montré que la présence du mutant $TP53^{R273H}$ exprimé par les cellules HT-29 favorise l'expression de c-Fos et c-Myc. L'expression de la β -tubuline fut utilisée comme marqueur d'intégrité et de contrôle de chargement. **B)** L'expression d'une c-Fos dans les cellules HCT 116 induit l'activité luciférase associée à la stimulation de la région promotrice du gène $P2RY6$. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM (n = 3) et exprimés comme étant la variation en comparaison du contrôle (pcDNA3.1 + pGL4.10). La significativité statistique fut déterminée par un test *t* non-pairé.

Le facteur de transcription c-Myc semble être plus exprimé dans les cellules invalidées pour p53 et dans les HT-29 que dans les HCT 116 exprimant $p53^{WT}$. Cela correspond aux résultats attendus, car $p53^{R273H}$ est capable d'activer le gène *MYC*. L'accumulation de $p53^{R273H}$ dans les cellules HT-29 semble également augmenter l'expression du facteur de transcription c-Fos, moins exprimé dans les cellules HCT 116 exprimant p53 normale et quasiment absent dans les cellules invalidées pour p53. Puisque p53 semble avoir une influence sur l'expression de c-Fos et que nos résultats suggèrent que $p53^{WT}$ et $p53^{R273H}$ régulent différemment la transcription de $P2RY6$, nous avons réalisé un essai luciférase afin de savoir si c-Fos pouvait lui aussi influencer la transcription. La transfection de la construction exogène c-Fos est effectuée de la même manière que les transfusions précédentes. Les résultats sont présentés sur la Figure 31B et montrent que l'expression de c-Fos semble stimuler la transcription de $P2RY6$ dans les HCT 116.

Ainsi, des essais luciférase ont permis de caractériser la liaison de p53 et c-Fos sur le promoteur de *P2RY6*, en condition de surexpression. Des expériences de CHIP semblent confirmer ces résultats. Cependant, la transcription d'un gène ne garantit pas l'expression de la ou des protéine(s) associée(s). Ainsi, en l'absence d'anticorps valables dirigés contre le récepteur P2Y₆, des essais fonctionnels ont été réalisés afin de mesurer son activité. Les deux isoformes de P2Y₆ ont été clonées dans le vecteur pIRESpuro, comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Le vecteur pIRESpuro est un vecteur bicistronique permettant la traduction du gène d'intérêt et du gène de résistance à un antibiotique (ici, la puromycine) à partir d'un seul ARNm et l'expression de la protéine d'intérêt en grande quantité. Les cellules HEK-293 surexprimant une des deux isoformes du récepteur P2Y₆ ont été stimulées avec différentes doses d'UDP. Vingt-quatre heures après, la phosphorylation de la protéine p42/44 ou ERK a été mesurée par un essai *AlphaScreen SureFire*. Les résultats sont présentés dans la Figure 32A. Afin de faire corrélérer l'activité et l'expression de ERK, des immunobuvardages ont été réalisés. Tel que présenté à la Figure 32B, nous avons détecté l'expression de p42/44, de sa forme phosphorylée P-p42/44 et de la forme phosphorylée de CREB suite des stimulations à différentes doses d'UDP. La phosphorylation de la protéine ERK témoigne de l'activation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK par la PKC à la suite de la liaison de l'UDP à P2Y₆ et la phosphorylation de CREB montre son activation suite à l'augmentation du calcium intracellulaire.

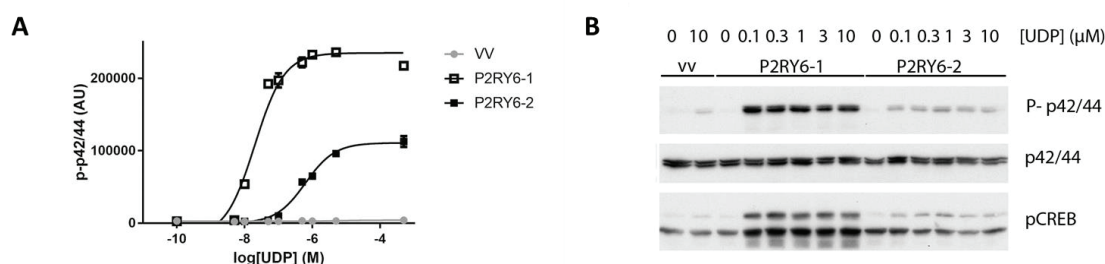


Figure 32 : La phosphorylation de ERK et CREB traduit l'activation de voies de signalisation suite à la liaison de l'UDP sur le récepteur P2Y₆. **A)** Quantité de P-p42/44 suite à une stimulation à l'UDP de 10 min dans des cellules HEK-293 surexprimant la construction pIRESpuro-P2RY6-1 (isoforme 1), pIRESpuro-P2RY6-2 (isoforme 2) ou le vecteur pIRESpuro vide (contrôle). **B)** Détection des protéines p42/44, P-p42/44 et pCREB par immunobuvardage réalisé à partir de lysats de cellules HEK-293 surexprimant le vecteur pIRESpuro vide (contrôle), la construction pIRESpuro-P2RY6-1 (isoforme 1) ou pIRESpuro-P2RY6-2 (isoforme 2), en réponse à différentes doses d'UDP.

La quantité de ERK phosphorylée augmente nettement après stimulation de l'isoforme 1 avec l'UDP et de façon moins importante après l'activation de l'isoforme 2. Cependant, cela suggère que l'isoforme 2 est activable à l'UDP. Ces résultats sont confirmés par l'immunobuvardage présenté sur la Figure 32B. Les niveaux de ERK sont constants dans les trois conditions, mais sa phosphorylation augmente dans les cellules surexprimant l'isoforme 1 du récepteur de P2Y₆. Comme attendu, elle n'est pas activée à 0 µg d'UDP, mais la forme phosphorylée est détectée dès 0,1 µg d'UDP. Il en est de même dans les cellules surexprimant l'isoforme 2 de P2Y₆. pERK n'est pas détectée à 0 µg d'UDP, mais seulement à partir de 0,1 µg d'UDP et son niveau d'expression est visiblement moins élevé que dans les cellules surexprimant l'isoforme 1. L'expression de pCREB est comparable à celle P-p42/44 : son expression augmente dès 0,1 µg d'UDP à la fois dans les cellules surexprimant l'isoforme 1 et dans celles surexprimant l'isoforme 2. Cependant, son activation est plus marquée dans les HEK-293 surexprimant l'isoforme 1. Cela vient appuyer l'hypothèse que l'isoforme 2 de P2Y₆ est activable par l'UDP, mais d'autres études sont à mener afin de déterminer la signalisation et le rôle précis de cette isoforme.

DISCUSSION

Il est important d'élucider le contrôle de l'initiation de la transcription, car il constitue un composant majeur du réseau de régulation des gènes qui mène au développement et à la diversité animale (Levine & Davidson 2005 ; Levine & Tjian 2003). Le modèle le plus simple consiste à dire que les facteurs de transcription interagissent avec les promoteurs des gènes afin d'influencer la transcription et que cette interaction est régulée par les éléments *cis* régulateurs. Dans ce cas, la fonction des promoteurs est assez simple, mais plusieurs études montrent que les promoteurs ont une structure complexe et possèdent plusieurs sites d'initiation de la transcription (nucléotide +1) à des positions précises (Carninci *et al.* 2006; Smale & Kadonaga 2003). Dans cette étude, nous avons utilisé des expériences de *primer extension 5' RACE* pour nous permettre d'identifier un site d'initiation de la transcription alternatif de différents variants d'ARNm du gène *P2RY6*. Plusieurs nucléotides +1 ont été déterminés après clonage de la région 5'UTR des variants d'ARNm V5 et V9 de *P2RY6*. Notons que la plupart des nucléotides identifiés se situent dans la même région étroite d'ADN suggérant l'initiation de la transcription à cet endroit. Le décalage de quelques nucléotides entre les différents clones peut être expliqué de plusieurs façons. D'abord, même si théoriquement, le +1 est un nucléotide bien précis, puisqu'il se trouve dans la région 5'UTR non traduite du brin d'ARNm, une différence de quelques nucléotides n'empêche pas la synthèse d'une protéine fonctionnelle. En effet, la traduction du variant 5 est initiée au niveau d'une ATG situé plus loin en aval. Tout comme la région promotrice d'un gène n'est pas définie d'un nucléotide précis à un autre, le +1 peut éventuellement varier d'un ARNm à l'autre. Cependant, il est possible que ces décalages soient dus à l'ajout de la séquence poly(T) durant l'expérience. La présence d'une séquence répétitive pourrait engendrer des erreurs lors du séquençage. Aussi, pour procéder au clonage, il est nécessaire de purifier l'ADN préalablement chargé sur gel d'agarose. Pour permettre une meilleure purification, mais également pour ne conserver que l'ADN d'intérêt, la quantité de gel isolé doit être la plus petite possible pouvant exclure certains transcrits, ce qui pourrait expliquer la différence de quelques nucléotides entre les différents clones. Un clonage direct des produits de PCR II pourrait alors être envisagé. Enfin, augmenter le nombre de clones permettrait d'identifier d'autres sites d'initiation de

la transcription situés avant l'ATG, pour le variant d'ARNm V9 de *P2RY6*. De plus, cela permettrait de confirmer que la région d'ADN génomique ciblée dans cette expérience constitue bien une autre région promotrice potentielle du gène *P2RY6*. Alors, pourquoi avoir besoin de sites d'initiation de la transcription différents alors que plusieurs d'entre eux codent pour la même isoforme de protéine possédant le même ATG nécessaire à l'initiation de la traduction ? L'explication la plus simple est que les sites soient sélectionnés différemment selon le tissu, le type cellulaire ou le stade de développement. Il a aussi été proposé que certains sites d'initiation soient actifs afin d'assurer une expression basale de la protéine et que les autres soient utilisés lorsque son expression doit être augmentée. En effet, c'est l'équipe de Schroeder qui propose cette hypothèse après leur étude portant sur la protéine FOXP2 (Schroeder & Myers 2008). Le gène encodant pour cette protéine serait associé à au moins quatre sites d'initiation de la transcription. Deux d'entre eux semblent spécifiques à des types cellulaires particuliers tandis que les deux autres, situés dans un îlot CpG, sembleraient être exprimés de façon plus ubiquitaire (Schroeder & Myers 2008). Ces résultats suggèrent que la sélection du site d'initiation de la transcription est un processus finement régulé. Nous avons établi le profil d'expression de différents variants d'ARNm de *P2RY6* (1, 3, 6, 7, 2, 5 et 9) dans trois lignées cellulaires cancéreuses colorectales humaines (HCT 116, HT-29 et Caco-2) afin de déterminer si les sites d'initiation de transcription variaient selon le type cellulaire. Les résultats sont présentés dans la Figure 22. Les variants les plus présents dans les HCT 116 sont les variants 1, 3 et 6, tous les trois associés à la région 1 du promoteur de *P2RY6*. Le variant 6 est majoritaire dans les HT-29. Les Caco-2 présentent une quantité importante des variants 5 et 9, associés à la région 4 du promoteur de *P2RY6*. De façon intéressante, dans les trois lignées, le variant 9 codant pour l'isoforme 2 du récepteur P2Y₆, est retrouvé en quantité plus importante que le variant 5. Cela suggère que la transcription de la région 4 favorise la synthèse de ce variant en particulier et donc peut-être l'expression de la seconde isoforme. Cependant, tous les autres variants étant associés à l'isoforme 1 connue du récepteur, il est probable qu'elle reste la forme majoritairement exprimée dans la cellule. L'obtention de profils d'expression différents selon les lignées cellulaires vient appuyer l'hypothèse que la sélection du site d'initiation de la transcription est un processus finement régulé. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à la régulation de la transcription du gène *P2RY6*,

notamment par p53, muté dans plus de 50% des cancers et muté de façon précoce dans le cancer colorectal associé à la colite. Rappelons également que les trois lignées cellulaires étudiées expriment différentes formes de p53 comme indiqué dans le Tableau 2.

Après avoir vérifié la présence de séquences *consensus* reconnues par le facteur de transcription p53 (via l'outil PROMO de Algen), nous avons réalisé des essais luciférase. Cependant, la présence de ses séquences *consensus* ne signifie pas qu'un facteur de transcription va forcément s'y lier. *In vivo*, la liaison de p53, ainsi que d'autres facteurs de transcription, à l'ADN est régulée par divers éléments, tels que la structure de la chromatine. De plus, il a déjà été observé qu'un facteur de transcription pouvait se lier à des régions d'ADN ne correspondant pas à la séquence *consensus* (Wells & Farnham 2002). L'équipe de Nikulenkov a analysé les séquences de 500 sites de liaison de p53 sélectionnés de manière aléatoire afin de définir la séquence *consensus* reconnue par p53. Leurs résultats concordent avec la séquence précédemment définie dans la littérature (Smeenk *et al.* 2008). Cependant, la séquence peut varier légèrement d'un promoteur à l'autre. Certains nucléotides sont retrouvés dans tous les promoteurs étudiés, à la même position dans la séquence *consensus* alors que d'autres varient d'un promoteur à l'autre (Nikulenkov *et al.* 2012). Cela suggère que certains sont plus essentiels que d'autres à la liaison du facteur de transcription correspondant. Ces différences peuvent influencer l'affinité de la protéine pour l'ADN. Les séquences qui correspondent le mieux à la séquence *consensus* vont être reconnues plus facilement par le facteur de transcription même si celui-ci est présent à de faibles niveaux dans la cellule alors que les séquences qui divergent vont présenter une plus faible affinité. Ainsi, la présence de ces séquences particulières n'est qu'un outil prédictif. C'est pourquoi, les essais luciférase permettent de faire une première étude de la liaison du facteur de transcription p53 sur le promoteur de *P2RY6*.

Ces expériences ont été réalisées dans des cellules HCT 116, surexprimant les gènes *TP53^{WT}* et *TP53^{R273H}* clonés dans le vecteur pCMV-Neo-Bam et le promoteur de *P2RY6*, cloné en amont du gène de la luciférase *luc2* dans le vecteur pGL4.10[*luc2*]. Les premiers résultats présentés sur la Figure 25 suggèrent une liaison de p53 sur les régions promotrices 1 et 4. La région 1 est activée seulement par *TP53^{WT}* et la région 4 est activée à la fois par

TP53^{WT} et par le mutant *TP53^{R273H}*. Cela nous a permis de faire une première sélection, parmi les quatre régions testées. En effet, nous avons donc décidé de continuer les travaux uniquement avec la région 1, associée à quatre variants d'ARNm (V1, V3, V6 et V8) et la région 4 puisqu'elle semble être activée à la fois par la forme sauvage de p53 et par la forme mutante p53^{R273H}. La région 2, quant à elle, ne présente qu'une activité très faible. Enfin, malgré une légère activité luciférase observée avec la région 3, nous ne l'avons pas sélectionnée, car selon les profils d'expression de variants présentés à la Figure 24, le variant 2 associé n'est que peu exprimé dans les lignées cellulaires étudiées. Enfin, la protéine mutante p53^{V143A} ne présente qu'une faible activité transcriptionnelle. Ce faible potentiel de transactivation pourrait être associé au fait que p53^{V143A} est un mutant instable de p53 (A. C. Joerger & Fersht 2007). Il est rapidement dégradé ce qui l'empêche de jouer son rôle de facteur de transcription. À la lumière de ces résultats, nous avons poursuivi nos travaux de caractérisation avec les protéines p53^{WT} et p53^{R273H}. Une courbe dose-réponse a ensuite été effectuée (Figure 26) afin de s'assurer que les effets d'activation étaient bien dus aux vecteurs transfectés. Nous avons observé, pour la région 1, que l'activité luciférase augmentait en même temps que la quantité de *TP53^{WT}* transfectée. Cela corrèle avec les résultats obtenus précédemment qui suggéraient déjà que la région 1 répondait à p53^{WT}. La région 4 répond aussi à la forme normale de p53, mais également à sa forme mutante R273H, comme le laissaient penser les premiers essais réalisés. De plus, comme attendu, le mutant V143A ne semble pas montré d'activation. Cette forme de p53 est rapidement dégradée dans la cellule, ce qui l'empêche de jouer son rôle de facteur de transcription (Joerger & Fersht 2007). Afin de localiser avec plus de précision le site de liaison exact de p53 sur les régions 1 et 4 du promoteur de *P2RY6*, nous avons généré des constructions tronquées du promoteur original par digestions enzymatiques en utilisant différentes enzymes de restriction. Les résultats sont présentés sur la Figure 27. En ce qui concerne la région 1, la protéine de type sauvage provoque une activation plus importante sur l'insert de 1535 pb, comparativement aux plus petits fragments. Il est possible que le ou les sites de forte affinité pour p53^{WT} soient présents dans la partie proximale de l'insert. Cependant, puisque l'insert est de plus grande taille, nous pourrions supposer que les sites de liaison soient plus nombreux. En effet, nos prédictions informatiques ont montré la présence de plusieurs séquences *consensus* tout le long des différentes régions promotrices de *P2RY6*.

Ainsi, si on considère que p53 peut se lier à différents endroits sur le promoteur, on peut imaginer qu'en réduisant la taille de la séquence d'ADN étudiée, nous avons excisé des sites de liaison. Ainsi, la quantité de facteurs de transcription liée à l'ADN est moins grande et l'activation transcriptionnelle est moins importante. Les différents fragments générés à partir de la région 4 semblent répondre de la même façon, quelle que soit leur taille. Cependant, comme précédemment, la forme sauvage de p53 provoque une activation plus marquée. Notons ici qu'il a été montré plusieurs fois dans la littérature que p53^{R273H} est capable d'activer la transcription de gènes cibles : *MYC* (Frazier *et al.* 1998), *mll1*, *mll2*, *moz* (Zhu *et al.* 2015), *NRD1* (Coffill *et al.* 2012).

Comme mentionné dans l'introduction, la protéine p53 s'organise en tétramère pour se lier à l'ADN et la proportion de protéine normale et de protéine mutée peut influencer l'affinité apparente de p53 à lier une séquence promotrice donnée (Chan *et al.* 2004). Nous avons donc voulu étudier l'effet de compétition entre les deux formes de p53 étudiées sur leur capacité à lier le promoteur de *P2RY6*. Les résultats sont présentés sur la Figure 29. L'activation transcriptionnelle de la région 1 diminue lorsque la quantité de p53^{R273H} transfectée augmente. Ce résultat est conforme à celui attendu, car ce mutant n'activait pas la région 1 dans les essais précédents. Donc, en augmentant la quantité de p53^{R273H}, celle-ci va s'associer à la protéine de type sauvage pour former un tétramère. Alors, si celui-ci est formé majoritairement de la forme mutante, il ne se liera pas à la région 1 qui n'est pas un site de liaison pour p53^{R273H}. À l'opposé, l'activation de la région 4 ne diminue que légèrement lorsque l'on augmente la quantité de p53^{R273H} transfectée. Encore une fois, ces résultats sont conformes avec le résultat attendu, car nous avons déjà observé que la région 4 était activée par les deux formes de p53 étudiées. La légère diminution observée peut venir du fait que l'activation causée par la forme mutante est moins importante que celle observée avec la forme sauvage. Donc si la forme mutante est prédominante, il est logique que l'activation observée soit moins forte.

La transfection transitoire, telle qu'effectuée dans ces essais luciférase est une technique rapide et simple, mais présente quelques inconvénients. Il est difficile de contrôler le nombre de copies insérées dans les cellules et la taille des vecteurs à transfecter est limitée (Wells & Farnham 2002). Ainsi, selon l'efficacité de la transfection, les cellules

transfectées vont exprimer des quantités différentes de p53. Lors d'un essai luciférase, la présence du gène *Renilla luciferase* permet de normaliser les résultats et de pouvoir les comparer d'une expérience à l'autre. Par contre, à cause des différents taux de p53 présents dans les cellules, selon la transfection effectuée, il est difficile de comparer leurs niveaux d'expression afin de faire le faire corrélérer avec la capacité de p53 à activer la transcription du promoteur de *P2RY6*. Cependant, l'immunobuvardage présenté sur la Figure 28 suggère que la forme R273H est plus exprimée par les cellules que la forme sauvage, alors qu'elle active de façon moins importante la transcription. Ce n'est donc pas le niveau de protéine exprimée qui détermine l'activation du promoteur de *P2RY6*. Comme mentionné plus tôt, la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN dépend de son affinité pour le site de liaison en question. Aussi, la liaison à l'ADN elle-même n'est pas toujours suffisante pour engendrer l'activation de la transcription. L'équipe de Kaeser a montré qu'après avoir soumis les cellules à des rayons ultraviolets, la protéine p53 est présente au promoteur de *MDM2*, mais sa transcription est inhibée via le recrutement d'un co-répresseur (Kaeser & Iggo 2002). Les transfections transitoires ne tiennent pas compte non plus des marques épigénétiques portées par l'ADN ni de l'état de la chromatine, qui est un important régulateur de l'expression des gènes *in vivo*. En effet, l'état de condensation de la chromatine et le positionnement des nucléosome pourraient rendre inaccessible un site de liaison de p53 sur une des régions promotrices de *P2RY6*. C'est pourquoi nous souhaitons générer des lignées cellulaires stables surexprimant une des formes de p53 étudiées. Un sous-clonage des gènes *TP53^{WT}* et *TP53^{R273H}* a été effectué dans le vecteur viral pLenti Adaptator. Il a été cependant très difficile de générer des cellules HCT 116 surexprimant *p53^{WT}*. Très peu de cellules ont survécu à la sélection à l'ampicilline. *P53^{WT}* étant un suppresseur de tumeur important, ciblant des gènes responsables de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN (Ludwig *et al.* 1996), il n'est pas anormal que les cellules meurent lorsqu'elles la surexpriment. À l'opposé, l'infection et la sélection des cellules avec la forme mutante *p53^{R273H}* n'a pas posé de problème. Nous avons tenté de faire de nouveaux essais luciférase sur les cellules sélectionnées, mais nous n'avons observé aucune activation de la transcription du promoteur de *P2RY6*. Comme la sélection a été longue et nocive pour la plupart des cellules, nous supposons que les cellules ayant survécu soient celles qui exprimaient un faible taux de p53 et le signal obtenu était

trop faible pour être détecté. Aussi, lorsqu'une protéine est surexprimée de façon stable, il est possible que les cellules mettent en place des mécanismes de compensation pour pallier aux éventuels dommages que peut causer la surexpression. De plus, comme la surexpression d'une protéine n'est pas représentative des conditions physiologiques, le facteur de transcription surexprimé peut alors se lier à des sites sur l'ADN normalement non régulés dans des conditions physiologiques (Weinmann & Farnham 2002). Cependant, si la liaison a lieu dans de telles conditions, des expériences subséquentes peuvent être effectuées afin d'étudier l'effet de la protéine endogène. Si les résultats sont négatifs avec la protéine endogène, il est possible d'affirmer que ce n'est pas parce que le facteur de transcription ne peut pas se lier à l'ADN, mais que d'autres facteurs régulent cette liaison, tels que la compétition des différentes formes de p53, observée précédemment. *In vivo*, la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN dépend aussi de l'état de compaction de la chromatine. En effet, les essais luciférase ne tiennent pas compte des marques épigénétiques. C'est pourquoi une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été réalisée.

Les expériences de ChIP permettent d'identifier les sites de liaison directs d'un facteur de transcription ou ceux sur lesquels il agit comme co-activateur ou corépresseur, en tenant compte des marques épigénétiques portées par l'ADN. Cela élimine les cibles indirectes activées par une cascade de phosphorylation subséquente par exemple (Weinmann & Farnham 2002). La fixation au formaldéhyde permet de stabiliser les protéines liées à l'ADN ainsi que les complexes protéiques. L'ADN fixé est ensuite soniqué afin d'obtenir des fragments de la taille désirée. La résolution de l'expérience dépend en grande partie de la taille des fragments d'ADN obtenus, mais il est difficile de générer des fragments plus petits que quelques centaines de paires de bases (Wells & Farnham 2002). Ensuite, l'ADN et les complexes protéiques sont immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt, ici p53. L'ADN est amplifié par PCR quantitative avec les amorces sélectionnées. Plusieurs contrôles doivent être effectués afin de s'assurer que le protocole a fonctionné (Weinmann & Farnham 2002). D'abord, la taille des fragments d'ADN obtenus après sonication est à vérifier en visualisant l'ADN sur un gel d'agarose. Pour nos expériences, nous nous sommes assurés d'avoir des fragments

d'ADN entre 200 et 400 pb. Il est important d'adapter le nombre de sonications. En effet, de meilleurs résultats ont été obtenus après seulement 15 sonications, par rapport à 20 sonications comme nous le faisons au départ. Nous avons supposé qu'un nombre de sonications trop important pourrait fragiliser les liaisons des protéines à l'ADN. Après, l'IP peut être exécutée. Les anticorps ne fonctionnent pas tous en IP et plusieurs d'entre eux peuvent être à tester. Il est donc recommandé d'effectuer un immunobuvardage après l'IP afin de tester l'efficacité des anticorps utilisés. En plus des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt, un contrôle positif dirigé contre l'ARN polymérase II et un contrôle négatif IgG sont à utiliser. L'ARN polymérase II étant présente sur les promoteurs des gènes transcrits, un enrichissement important devrait être observé après amplification de l'ADN. Les IgG constituant un contrôle négatif, aucune amplification d'ADN ne devrait avoir lieu. L'enrichissement présent dans le contrôle IgG doit être considéré comme non spécifique et sert à normaliser les résultats obtenus avec les anticorps anti-ARN polymérase II et anti-p53. Pour diminuer le signal non spécifique, les lysats cellulaires sont pré-incubés avec les billes magnétiques utilisées pour l'élution et une solution de BSA, avant l'ajout des anticorps. Ainsi, une partie de ce qui est susceptible de se fixer aux billes de façon non spécifique est éliminée. Les billes sont ensuite remplacées par les anticorps pour l'IP. Puis, de nouvelles billes magnétiques sont ajoutées afin que les anticorps s'y fixent et lavées avec différents tampons, toujours dans le but d'éliminer le signal non spécifique. La stringence des tampons est à surveiller. Nous avons réalisé des immunobuvardages après chaque étape de lavage afin de vérifier que p53 était toujours présente dans nos échantillons. Enfin vient l'étape d'élution puis la PCR quantitative peut être effectuée avec les différentes amorces sélectionnées. Là encore, les amorces utilisées doivent être préalablement testées afin de vérifier leur efficacité et de s'assurer de l'absence de la formation de dimères. Nous avons utilisé deux paires d'amorces complémentaires au promoteur de *P2RY6*, spécifiques à la région 1 et 4 respectivement. Une paire d'amorces complémentaires au promoteur de p21 a été également utilisée. P21 étant une cible bien connue de p53 constitue un contrôle positif (Kaeser & Iggo 2002). Si aucun enrichissement n'est observé avec l'ARN polymérase II ou p53, l'IP ou la PCR quantitative est à remettre en question. De la même façon, une paire d'amorces correspondant au promoteur de GAPDH a été employée. Ce promoteur ne faisant pas partie des cibles de p53 (Kaeser &

Iggo 2002), un enrichissement devrait être observé seulement après l'IP de l'ARN polymérase II. Nos résultats présentent les différents enrichissements observés en PCR quantitative selon l'IP effectuée (contrôle ADN polymérase II, p53 ou contrôle IgG) et la paire d'amorces utilisée. La quantité d'ADN amplifié avec le contrôle IgG étant normalisée à 1.

Dans les HCT 116 (Figure 30A) le promoteur de GAPDH est présent dans l'IP de l'ARN polymérase II, mais pas dans l'échantillon p53, comme attendu. Le promoteur de p21 est enrichi dans l'IP de l'ARN polymérase II seulement. Cependant, nous supposons qu'un enrichissement plus important aurait pu être observé en stimulant préalablement l'expression de p53. La région 1 présente un enrichissement plus important dans l'IP de l'ARN polymérase II que dans celle de p53. En effet, l'ARN polymérase II est présente sur tous les promoteurs de gènes transcrits. Elle peut donc se fixer sur la région 1 de *P2RY6* à chaque fois qu'il est transcrit même lorsqu'il n'est pas régulé par p53. L'enrichissement dans l'IP de p53 représente seulement la portion de promoteur où se fixe p53. La région 4 est enrichie dans l'IP de l'ARN polymérase II, mais pas dans l'IP de p53, ce qui suggère qu'elle est transcrite, mais non régulée par p53. Cela concorde également avec nos résultats précédents qui montraient que p53^{WT} ne se liait pas sur la région 4 de *P2RY6*. Avec les cellules HT-29 (Figure 30B), un enrichissement du promoteur de p21 est observé dans les IP de l'ARN polymérase II ainsi que dans p53, comme attendu. Cependant, une quantité importante d'ADN correspondant au promoteur de GAPDH est également observée dans les deux IP. Or, cette région constitue un contrôle négatif de liaison de p53. Une équipe observe un résultat similaire et explique que la liaison sur le promoteur de GAPDH serait une liaison non spécifique du groupement carboxyle en C-terminale de la protéine p53 (Pavletich *et al.* 1993). De façon intéressante, la région 1 est peu ou pas présente alors que la région 4 est retrouvée dans les deux IP, ce qui suggère bien une liaison de p53 à cette région d'ADN. Ces résultats sont cohérents avec les résultats des essais luciférase puisque le mutant R273H, exprimé dans les HT-29, était capable d'induire la transcription de la région 4 du promoteur de *P2RY6*. Les HCT 116 expriment une protéine p53 normale alors que les HT-29 expriment sa forme mutante p53^{R273H}. Comme nos précédents essais l'ont montré, les deux formes de p53 n'entraînent pas les mêmes réponses transcriptionnelles et

c'est ce que semblent confirmer les résultats des expériences de ChIP. Cependant, plusieurs autres facteurs sont à prendre en compte afin d'interpréter les résultats.

Comme signalé précédemment, il est possible qu'un facteur de transcription se lie sur le promoteur d'un gène cible, mais cela ne signifie pas nécessairement que ce gène est régulé par la protéine en question (Kaeser & Iggo 2002). La liaison de p53 avec l'ADN peut être modulée par plusieurs éléments. Son affinité n'est pas la même pour tous les promoteurs. Il semblerait que p53^{WT} lie avec une plus forte affinité les promoteurs associés à l'arrêt du cycle cellulaire que ceux associés à l'apoptose. De plus, les sites de liaison de haute affinité, comme celui retrouvé dans le promoteur de p21, correspondent mieux à la séquence *consensus* reconnue par p53^{WT} que les sites des promoteurs associés à l'apoptose (Ludwig *et al.* 1996; Chen *et al.* 1996). Aussi, selon le stress subi par les cellules, les gènes activés par p53 ne sont pas les mêmes (Kaeser & Iggo 2002). Les sites occupés par p53 sont les mêmes, indépendamment du mécanisme d'activation de p53 ou du destin cellulaire, car son affinité pour l'ADN ne varie pas. Ce patron de liaison est alors défini comme le programme transcriptionnel de p53 « par défaut » (Shaked *et al.* 2008). Cependant, une étude suggère que la phosphorylation de p53 sur ses sérines 15 et 46 affecte son programme transcriptionnel (Smeenk *et al.* 2008), via le recrutement d'autres facteurs de transcription. Ce qui confirme là encore que la liaison elle-même, de p53 à un promoteur, n'est pas suffisante pour l'expression du gène associé. Aussi, d'autres mécanismes de régulation entrent en compte *in vivo*. En effet, en absence de stress, p53 est régulée négativement via son interaction avec MDM2, une ubiquitine ligase, et va être dégradée par le protéasome. Pour être activée, p53 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. Sans cette régulation allostérique, p53 ne se lie pas à ses gènes cibles alors que, *in vitro*, la liaison semble avoir lieu quand même (Meek 1999). Cependant, le but de nos expériences est d'observer la régulation de l'expression de *P2RY6* par p53 dans le cancer colorectal. Or, la transformation oncogénique représente un stress pour la cellule. Nous considérons que p53 est activée dans les deux cas, *in vivo* et *in vitro* et donc que notre modèle cellulaire est adapté.

Les expériences de ChIP prennent en compte l'état de la chromatine. Comme souligné dans l'introduction, p53 est capable d'induire des modifications épigénétiques. De plus, les changements induits peuvent varier selon la forme de p53 exprimée. P53^{WT}

interagit avec de nombreux régulateurs épigénétiques comme p300, une histone acétyltransférase, CARM1, une méthyltransférase (An *et al.* 2004) ou le complexe SWI/SNF (Lee *et al.* 2002). Une étude a montré qu'après la liaison de p53^{WT} à ses éléments de réponse dans le génome, le complexe SWI/SNF est recruté au promoteur. La chromatine est alors accessible à l'ARN polymérase II et les gènes cibles de p53^{WT} sont transcrits (Lee *et al.* 2002). Les mutants gain-de-fonction de p53 peuvent avoir d'autres cibles dans l'ADN que la protéine normale et sont aussi capables de recruter des enzymes entraînant le remodelage de la chromatine. Par exemple, l'équipe de Pfister s'est intéressée à l'expression du récepteur à activité tyrosine kinase VEGFR2 codé par le gène *KDR*. P53 mutée stimule l'expression de VEGFR2 et donc la croissance oncogénique et maligne. L'augmentation de la transcription résulte de l'association de p53 avec les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF au promoteur de *KDR*. Dans le cas de la perte de p53 mutée ou de la déplétion du complexe SWI/SNF, le promoteur de *KDR* est occupé par des nucléosomes et sa transcription diminue (Pfister *et al.* 2015). Il est intéressant de noter que très peu de choses sont connues sur la répression transcriptionnelle par p53. Nous avons tout de même mentionné plus tôt et montrer avec nos expériences que la présence de formes mutées dans le tétramère de p53 pouvait inactiver la transcription (Chan *et al.* 2004).

Les essais luciférase effectués montrent d'abord que p53^{WT} est capable de se lier à deux régions promotrices de *P2RY6* et que p53^{R273H} est capable d'activer la transcription de la région 4. Cependant, les expériences de ChIP exécutées dans les HCT116 ne permettent pas de dire que p53^{WT} se lie plus sur la région 1 ou la région 4. Au contraire, dans les HT-29 exprimant la p53^{R273H}, la région 4 semble être enrichie, comparativement à la région 1, ce qui corrèle avec les résultats obtenus en essais luciférase. Il est possible que l'effet de p53 soit indirect et passe par son interaction avec d'autres facteurs de transcription. En effet, la fixation au formaldéhyde permet également de stabiliser les complexes protéiques. Donc même si de l'ADN est amplifié grâce à la réaction de PCR quantitative, une vérification supplémentaire est nécessaire afin d'affirmer que p53 se lie directement à l'ADN. Les essais luciférase nous suggèrent que oui, mais des immunobuvardages pourraient être effectués afin de confirmer les résultats. Nous avons observé que l'accumulation de la forme mutée p53^{R273H} dans les HT-29 augmentait l'expression de c-

Fos et c-Myc. D'autre part, l'expression forcée de c-Fos, dans les HCT 116 activait la transcription de *P2RY6*. Il serait possible d'immunoprécipiter p53 et de réaliser un immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre c-Fos ou c-Myc afin de vérifier leurs interactions potentielles. C-Fos est un facteur de transcription qui dimérise avec ceux de la famille Jun afin de former le complexe AP-1, impliqué dans la prolifération, différenciation et survie cellulaire (Angel & Karin 1991). C-Myc est lui aussi un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et la transformation oncogénique. Si on considère que le mutant gain-de-fonction p53^{R273H} stimule la prolifération cellulaire, il est possible que son effet passe par son ou ses interactions avec ces protéines. Il est intéressant de noter que l'immunoprécipitation de la chromatine permet également d'identifier de nouveaux gènes cibles ou ses sites de liaison à l'ADN ne correspondant pas à la séquence *consensus* reconnue par le facteur de transcription étudié. Pour cela, l'ADN obtenu après immunoprécipitation doit être séquencé. Si les séquences obtenues ne correspondent pas à la séquence *consensus*, il est probable que la liaison à l'ADN de la protéine étudiée ne soit pas directe et que son action passe par un autre facteur de transcription. Enfin, même si les expériences de ChIP permettent d'étudier les marques épigénétiques portées par l'ADN et diminuent les désavantages apportés par la surexpression, il est difficile de recréer *in vitro* les conditions physiologiques. Par exemple, certaines protéines se lient à des structures secondaires d'ADN, permettant de rapprocher deux séquences nucléotidiques éloignées sur l'ADN linéaire (Wells & Farnham 2002). Mais afin de se rapprocher le plus possible des conditions rencontrées *in vivo*, l'équipe de Wells et Farnham a réalisé en 2002 une immunoprécipitation de la chromatine sur des cultures primaires de tissus sains et de cancer colorectal. Ils ont observé une liaison plus importante du facteur de transcription TCF4, associée à la β -caténine sur le promoteur de c-Myc dans les tumeurs colorectales en comparaison avec les tissus sains. La voie Wnt/ β -caténine est connue pour être constitutivement active dans le cancer colorectal et c-Myc est également connu pour être impliqué dans la transformation oncogénique. Il n'est donc pas anormal qu'il y ait un lien entre les deux voies de signalisation. C'est pourquoi il serait intéressant de vérifier si c-Myc est régulé, directement ou non, par p53^{R273H}.

En résumé, nous avons montré que p53 pouvait se lier au promoteur de *P2RY6*, mais que les formes sauvage et mutante ne possédaient pas la même capacité de liaison à

l'ADN. En effet, d'après nos essais d'activité luciférase p53^{R273H} ne semble pas se lier à la région 1 du promoteur de *P2RY6*. Ces résultats furent confirmés par nos expériences de ChIP. Cependant, plusieurs facteurs sont à considérer avant d'affirmer que p53 active la transcription de *P2RY6 in vivo*. Aussi, il est possible que l'action de p53 normale ou mutée, soit indirecte et passe par son interaction avec d'autres facteurs de transcription tels que c-Fos ou c-Myc. Après l'expression génique, il est important d'aller vérifier l'expression protéique. Comme je l'ai rapporté dans l'introduction, de multiples étapes après la transcription sont contrôlées afin de réguler l'expression d'une protéine. Étudier le contrôle de la transcription n'est donc pas suffisant afin d'affirmer si une protéine est exprimée ou non. À cause de l'absence d'anticorps valables dirigés contre le récepteur P2Y₆, des tests fonctionnels ont été effectués afin de mesurer son activité. Les tests ont été réalisés avec les deux isoformes de P2Y₆. L'isoforme 2 semble avoir une activité moins importante que l'isoforme 1, ce qui est confirmé par les immunobuvardages effectués contre les formes phosphorylées de ERK et CREB. En effet, ces deux protéines sont des témoins de l'activation de P2Y₆ par l'UDP. La protéine ERK est phosphorylée lorsque la voie de signalisation Raf/MEK/ERK est activée par la PKC et la phosphorylation de CREB montre son activation suite à l'augmentation du calcium intracellulaire. Le rôle de l'isoforme 2 de P2Y₆ n'ayant pas été encore caractérisé, il est possible qu'il ait d'autres effets dans la cellule. Cependant, si l'activation de voies de signalisation telle que Raf/MEK/ERK varie d'une isoforme à l'autre, il serait intéressant de mesurer les quantités relatives des isoformes présentes dans la cellule. Sept des huit variants d'ARNm du gène *P2RY6* codent pour l'isoforme 1 du récepteur. Il est donc normal que cette isoforme soit la plus abondante. Toutefois, la forme p53^{R273H} semble activer la transcription de la région 4, qui code pour les variants 5 et 9 d'ARNm, eux-mêmes codant pour les isoformes 1 et 2 du récepteur P2Y₆ respectivement. Dans ce cas, il est probable que l'isoforme 2 soit retrouvée en plus grande quantité dans la cellule. Nous ne savons pas ce qui détermine la quantité relative des isoformes dans la cellule, mais deux phénomènes peuvent en être à l'origine : la sélection du site d'initiation de la transcription et l'épissage alternatif. Nous avons déjà mentionné en début de section qu'un gène pouvait être associé à plusieurs sites d'initiation de la transcription ou +1. L'équipe de Kawaji s'est intéressée à la distribution des sites d'initiation de la transcription, au sein d'un même promoteur et quatre motifs en sont

ressortis : un pic dominant, une distribution uniforme le long du promoteur, une distribution uniforme avec néanmoins un pic dominant et enfin, une distribution bi ou multimodale (Kawaji *et al.* 2006). Il a été suggéré que cette dernière pourrait correspondre à plusieurs promoteurs qui se chevauchent, ce qui peut avoir lieu si les promoteurs en question sont rarement utilisés. La présence d'un pic dominant est souvent associée à une expression spécifique à un tissu alors qu'une distribution uniforme est souvent liée aux îlots CpG et à une expression plus ubiquitaire (Carninci *et al.* 2006; Carninci *et al.* 2005). Puisque les motifs de distributions observés sont souvent similaires entre les souris et les humains, nous supposons que la sélection du site d'initiation de la transcription est finement régulée et qu'elle a une importance fonctionnelle. La sélection peut être régulée par le niveau de facteurs de transcription exprimés (Hochheimer & Tjian 2003) ou par l'épigénétique (Wolffe & Matzke 1999). Ce mode de régulation est un moyen pour les cellules de sélectionner un ou plusieurs +1 selon le tissu. Si la sélection ne dépendait que des propriétés de la séquence d'ADN, des variations entre les différents tissus n'auraient pas été observées. Outre le type cellulaire, les marques épigénétiques peuvent être définies selon l'empreinte génomique, c'est-à-dire selon l'origine parentale du chromosome (Wilkins 2005). Les chromosomes hérités de la mère ou du père présentent des patrons de méthylation différents et donc différents mécanismes de répression transcriptionnelle (Ferguson-Smith & Reik 2003; Mager *et al.* 2003). La compréhension de la sélection des sites d'initiation de la transcription, selon les tissus ou le contexte cellulaire, requiert une connaissance complète de la régulation de la transcription et de des mécanismes de recrutement de facteurs de transcription spécifiques au sein d'un promoteur. Il s'agit d'un processus hautement régulé et les promoteurs de doivent pas être considérés comme des éléments servant seulement à intégrer les signaux régulateurs (Kawaji *et al.* 2006). Une fois la transcription activée, un ARN primaire est synthétisé. Ce brin d'ARN va être épissé, les introns vont être excisés afin de donner un ARNm mature. Cependant, un même brin d'ARN primaire peut donner plusieurs ARNm matures, via le processus d'épissage alternatif. L'épissage est effectué par le spliceosome, qui s'assemble autour des sites d'épissage (à chaque intron) et peut être co-transcriptionnel. Chaque site d'épissage est composé d'une séquence *consensus* reconnue par les composants du spliceosome. L'extrémité 5' du transcrit est déterminée par le nucléotide +1 et son extrémité 3' n'est pas

déterminée par la fin de la transcription, mais par le site de polyadénylation (Kornblihtt *et al.* 2013). Ainsi, pour le gène *P2RY6*, deux groupes de variants (1, 3 6 et 8 ; 5 et 9), synthétisés à partir des mêmes +1, sont considérés comme des variants d'épissage. Les sites d'épissage peuvent avoir une forte ou faible activité selon leur divergence avec la séquence *consensus*. Souvent, les sites correspondant à celle-ci ont une activité constitutive et l'usage des sites de faible activité dépend du contexte cellulaire. L'étude de la structure des exons et introns a permis d'identifier des séquences *cis* régulatrices et permet de savoir si un exon est constitutif ou alternatif. Des combinaisons complexes d'éléments *cis* sont requises pour le contrôle de l'épissage alternatif dans les différents tissus (Kornblihtt *et al.* 2013). Également, la chromatine joue un rôle clé dans l'épissage alternatif à la fois via les modifications post-traductionnelles des histones et par le positionnement du nucléosome (Alló *et al.* 2010; Kornblihtt *et al.* 2013). La triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) est généralement enrichie au niveau des exons constitutifs, mais moins abondante aux exons alternatifs (Kolasinska-Zwierz *et al.* 2009). Il a été montré qu'elle régule l'épissage alternatif via le recrutement de la protéine adaptatrice MRG15. L'association de cette dernière avec le facteur d'épissage PTB réduit l'inclusion de certains exons alternatifs. Le positionnement des nucléosomes n'est pas hasardeux non plus. Les nucléosomes sont souvent positionnés aux exons (Andersson *et al.* 2009). Même si les introns ne sont pas démunis de nucléosomes, la distribution des nucléosomes sur les introns semble plus aléatoire. Aux exons, les nucléosomes semblent être fixés à un ratio d'un nucléosome par exon. La taille moyenne d'un exon correspond à la taille du fragment d'ADN enroulé autour du nucléosome (environ 150 pb). Il a été proposé que la position des nucléosomes aiderait la machinerie d'épissage à « trouver » les exons, car le nucléosome crée une pause dans l'élongation médiée par l'ARN polymérase II en marquant le début d'un exon. De plus, le positionnement des nucléosomes aux exons alternatifs est plus fort qu'aux exons constitutifs, ce qui suggère que les nucléosomes participent à la définition des exons (Berget 1995). L'existence d'exons dont l'inclusion est régulée augmente la diversité protéique. La question à se poser est : est-ce que les domaines protéiques codés par les exons alternatifs donnent des fonctions ou structures particulières distinctes que ceux codés par les exons constitutifs ? Deux études indiquent que les exons alternatifs spécifiques à des tissus codent souvent pour des régions protéiques présentant plus de sites de modifications

post-traductionnelles ou enrichies en sites d'interaction protéiques, augmentant ainsi la diversité fonctionnelle des protéines (Buljan et al. 2012; Gabut et al. 2011). Une fois l'épissage alternatif effectué, plusieurs variants d'ARNm sont générés, différant les uns des autres par leur région 5'UTR, en amont de l'ATG. Cette région n'est pas traduite, mais est susceptible de moduler la traduction des transcrits de P2Y₆ puisqu'elle constitue un site de liaison des ribosomes, mais aussi, car elle peut interagir avec la région 3' du variant d'ARNm afin d'inhiber la traduction. Dans ce cas, il est logique que la taille et la composition de la région 5'UTR jouent sur son interaction avec la région 3' et ainsi sur la traduction.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il semblerait que les variants d'ARNm de *P2RY6* soient synthétisés à partir de plusieurs sites d'initiation de la transcription. En effet, les variants détectés dans des cellules HCT 116 et Caco-2 suite à une expérience de 5'RACE correspondent aux prédictions informatiques de la base de données NCBI. De plus, ces résultats semblent être confirmés par des analyses de qPCR, spécifiques à chacun des variants d'ARNm. Les variants 1, 3, 6 et 8 seraient donc des variants d'épissage, ainsi que les variants 5 et 9. La sélection du site d'initiation de la transcription (+1) est une première étape de régulation de l'expression de *P2RY6* puisqu'il a été montré que la sélection des +1 pouvait varier selon le contexte cellulaire (Schroeder & Myers 2008). Plusieurs sites d'initiation de la transcription peuvent être présents au sein du même promoteur, mais l'éloignement des différents sites identifiés dans mes travaux suggère qu'il s'agit de plusieurs promoteurs (Kawaji *et al.* 2006). De plus, tous les variants codent pour l'isoforme 1 de la protéine, à l'exception du variant 9 qui coderait pour l'isoforme 2. Ce dernier variant présente en effet un ATG unique et localisé à la position 73 272 142 pb en comparaison à l'ATG de l'isoforme 1 qui se trouve à 73 264 455 pb. Il est donc probable qu'il s'agisse en effet d'une région promotrice différente. La sélection du +1 peut donc jouer sur le profil d'expression des différentes isoformes du récepteur P2Y₆ présentes dans la cellule. On peut imaginer que si la transcription de la région 4 est activée et que le variant 9 est synthétisé, une plus grande quantité d'isoforme 2 du récepteur sera présente dans la cellule. Cependant, de nombreuses étapes sont nécessaires afin de synthétiser une protéine à partir d'un brin d'ARNm et chacune d'entre elles est finement régulée. Ainsi, le profil d'expression des isoformes du récepteur P2Y₆ peut ne pas correspondre au profil de variants d'ARNm retrouvés dans la cellule.

Nous avons montré que p53 pouvait se lier au promoteur de *P2RY6*. Plus précisément, avec des constructions exogènes, nous avons vu que la forme sauvage de p53 pouvait se lier sur les régions 1 et 4 du promoteur de *P2RY6* et que la forme mutante p53^{R273H} pouvait se lier à la région 4. L'activation transcriptionnelle de p53^{R273H} est moins

importante que p53^{WT}. Donc, les deux formes étudiées régulent différemment l'expression de récepteur P2Y₆, comme semble le confirmer l'immunoprécipitation de la chromatine réalisée sur deux lignées cellulaires exprimant la forme sauvage ou mutante de p53. De nouvelles expériences de ChIP pourraient être faites afin d'avoir plus d'informations sur le promoteur de *P2RY6*. L'utilisation de fragments contenant des mutations permettrait d'identifier les nucléotides requis pour la liaison de p53 sur le promoteur de *P2RY6*. Dans ce cas, il serait important de réduire au maximum l'expression des protéines endogènes en travaillant avec des cellules invalidées pour p53 ou en utilisant des ARN interférents afin de diminuer l'expression de P2Y₆. Cela permettrait également de savoir si la liaison du facteur de transcription à l'ADN est directe ou indirecte. Par exemple, si le domaine de liaison à l'ADN de p53 est endommagé, mais qu'elle se fixe quand même à l'ADN, nous pourrions supposer que son interaction se fait via une autre protéine. Nous savons que p53^{R273H} garde sa capacité de liaison à l'ADN malgré sa mutation, mais qu'elle peut se lier à d'autres cibles dans l'ADN (Zhu *et al.* 2015) ou à des protéines n'ayant pas d'interactions avec la protéine normale (Liu *et al.* 2011). De plus, comme nous le suggèrent nos travaux, ce mutant semble augmenter l'expression des facteurs de transcription c-FOS et c-MYC. L'étape suivante serait d'étudier les interactions de p53 normale ou mutée avec les protéines du complexe transcriptionnel AP-1, par immunobuvardage faisant suite à une immunoprécipitation de la chromatine par exemple.

Enfin, l'épigénétique joue des rôles importants dans l'activation transcriptionnelle, la sélection du site d'initiation de la transcription et dans l'épissage alternatif. Dans un premier temps, un séquençage au bisulfite du promoteur de *P2RY6* permettrait d'identifier les cytosines méthylées de l'ADN. La méthylation de l'ADN étant généralement associée avec la répression transcriptionnelle, nous pourrions identifier avec plus de précision les sites de liaison de p53 sur le promoteur en ne considérant pas les régions méthylées comme des sites de liaison potentiels. Ces résultats pourraient être complétés avec d'autres expériences de ChIP réalisées sur des cellules traitées préalablement avec des inhibiteurs de méthylation tels que la zébularine (Zhou *et al.* 2002). En comparant les résultats obtenus avec des cellules non traitées, nous pourrions différencier les sites non activés à cause de la méthylation de l'ADN ou des histones, des sites qui ne sont jamais régulés par p53. En fait,

nous avons déjà effectué des premiers tests avec la zébularine sur des cellules HCT 116 surexprimant de façon stable p53^{WT} ou p53^{R273H}. Cependant, comme je l'ai mentionné précédemment, la sélection suite à l'infection a été particulièrement toxique pour les cellules. C'est pourquoi nous n'obtenons pas de résultats convaincants en essais luciférase avec ces lignées. Nous avons tout de même tenté de quantifier les différents variants d'ARNm de *P2RY6* dans les cellules infectées avec la forme normale ou mutée de p53, mais nos résultats n'ont pas été concluants.

En résumé, les résultats obtenus avec les constructions exogènes auront été validés par les effets des protéines endogènes, en tenant compte des marques épigénétiques portées par l'ADN et la chromatine. Des tests fonctionnels suggèrent que l'isoforme 2 du récepteur de P2Y₆ est capable d'être activée par l'UDP même si son rôle reste à caractériser. Si la forme mutante p53^{R273H} est capable d'activer la transcription du variant 9, codant pour l'isoforme 2, il est probable que cette isoforme soit plus exprimée dans les tissus cancéreux et peut-être y joue-t-elle un rôle notable. L'absence d'anticorps valides dirigés contre le récepteur P2Y₆ rend la détection de l'expression des protéines endogènes difficile. Il est toujours possible de cloner et marquer la protéine afin de la détecter par la suite en immunobuvardage de type Western mais cela ne permet de ne détecter que la construction exogène. Cependant, des études sont en cours, en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada) et Immune Biosolutions Inc. (Sherbrooke, QC, Canada) afin de développer des anticorps valides. Cela permettrait de comparer le profil d'expression de variants d'ARNm de *P2RY6* avec le profil d'expression des isoformes du récepteur P2Y₆ présentes dans la cellule ou dans les tissus. Enfin, cela aiderait grandement à la caractérisation de l'isoforme 2.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ahmed, D. et al., 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), p.e71.
- Akopova, I. et al., 2012. Imaging exocytosis of ATP-containing vesicles with TIRF microscopy in lung epithelial A549 cells. *Purinergic signalling*, 8(1), pp.59–70.
- Alberts, B., Wilson, J. & Hunt, T., 2008. *Molecular biology of the cell*, Garland Science.
- Alló, M. et al., 2010. Chromatin and alternative splicing. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 75, pp.103–11.
- An, W., Kim, J. & Roeder, R.G., 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell*, 117(6), pp.735–48.
- Andersson, R. et al., 2009. Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome research*, 19(10), pp.1732–41.
- Angel, P. & Karin, M., 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta*, 1072(2–3), pp.129–57.
- Bar, I. et al., 2008. Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*, 74(3), pp.777–84.
- Baumann, A. et al., 1994. Primary structure and functional expression of a Drosophila cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *The EMBO journal*, 13(21), pp.5040–50.
- Beaulieu, J.F. & Quaroni, A., 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *The Biochemical journal*, pp.599–608.
- Berezney, R. & Jeon, K.W., 1995. *Nuclear matrix : structural and functional organization*, Academic Press.
- Berget, S.M., 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *The Journal of biological chemistry*, 270(6), pp.2411–4.
- Bodin, P. & Burnstock, G., 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical research*, 26(8–9), pp.959–69.
- Brattain, M.G., Fine, W.D., et al., 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human

- colonic carcinoma. *Cancer research*, 41(5), pp.1751–6.
- Brattain, M.G., Brattain, D.E., et al., 1981. Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts. *Oncodevelopmental biology and medicine : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2(5), pp.355–66.
- Buljan, M. et al., 2012. Tissue-specific splicing of disordered segments that embed binding motifs rewires protein interaction networks. *Molecular cell*, 46(6), pp.871–83.
- Burnstock, G., 2008. Purinergic receptors as future targets for treatment of functional GI disorders. *Gut*, 57(9), pp.1193–4.
- Carninci, P. et al., 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature genetics*, 38(6), pp.626–35.
- Carninci, P. et al., 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), pp.1559–63.
- Caro, I. et al., 1995. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 116(2), pp.147–158.
- Chan, W.M. et al., 2004. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Molecular and cellular biology*, 24(8), pp.3536–51.
- Chen, W. et al., Functionalized congeners of tyrosine-based P2X(7) receptor antagonists: probing multiple sites for linking and dimerization. *Bioconjugate chemistry*, 13(5), pp.1100–11.
- Chen, X. et al., 1996. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes & development*, 10(19), pp.2438–51.
- Chmelarova, M. et al., 2013. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 15(2), pp.160–3.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), pp.469–80.
- Coco, S. et al., 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *The Journal of*

- biological chemistry*, 278(2), pp.1354–62.
- Coffill, C.R. et al., 2012. Mutant p53 interactome identifies nardilysin as a p53R273H-specific binding partner that promotes invasion. *EMBO Rep*, 13(7), pp.638–644.
- Cox, M.A. et al., 2005. The pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(2), pp.467–73.
- Delghandi, M.P., Johannessen, M. & Moens, U., 2005. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cellular signalling*, 17(11), pp.1343–51.
- Drake, R.L. (Richard L. et al., 2010. *Gray's Anatomie pour les étudiants*, Elsevier Masson.
- van Es, J.H. & Clevers, H., 2005. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends in molecular medicine*, 11(11), pp.496–502.
- Eshleman, J.R. et al., 1995. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*, 10(1), pp.33–7.
- Ferguson-Smith, A.C. & Reik, W., 2003. The need for Eed. *Nature genetics*, 33(4), pp.433–4.
- Fogh, J. & Trempe, G., 1975. New Human Tumor Cell Lines. In *Human Tumor Cells in Vitro*. Boston, MA: Springer US, pp. 115–159.
- Frazier, M.W. et al., 1998. Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Molecular and cellular biology*, 18(7), pp.3735–43.
- Freed-pastor, W. a & Prives, C., 2012. Mutant p53 : one name , many proteins Mutant p53 : one name , many proteins. , pp.1268–1286.
- Fridman, J.S. & Lowe, S.W., 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56), pp.9030–40.
- Gabut, M. et al., 2011. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell*, 147(1), pp.132–46.
- Gaiddon, C. et al., 2001. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Molecular and cellular biology*, 21(5), pp.1874–87.
- Giono, L.E. & Manfredi, J.J., 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell

- cycle checkpoints. *Journal of cellular physiology*, 209(1), pp.13–20.
- Grbic, D.M. et al., 2008. Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180, pp.2659–2668.
- Gregorieff, A. et al., 2005. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 129(2), pp.626–38.
- Gu, W. & Roeder, R.G., 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90(4), pp.595–606.
- Gurzu, S. et al., 2016. Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(30), pp.6764–75.
- He, X.C., Zhang, J. & Li, L., 2005. Cellular and molecular regulation of hematopoietic and intestinal stem cell behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049, pp.28–38.
- Hochheimer, A. & Tjian, R., 2003. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes & development*, 17(11), pp.1309–20.
- Hooper, L. V & Gordon, J.I., 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), pp.1115–8.
- Idzko, M., Ferrari, D. & Eltzschig, H.K., 2014. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), pp.310–7.
- Ishikawa, T. et al., 2003. Requirement for tumor suppressor Apc in the morphogenesis of anterior and ventral mouse embryo. *Developmental Biology*, 253(2), pp.230–246.
- Joerger, A.C. & Fersht, A.R., 2007. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15), pp.2226–42.
- Joerger, a C. & Fersht, a R., 2007. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15), pp.2226–2242.
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), pp.484–492.
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 13(7), pp.484–92.

- Kaeser, M.D. & Iggo, R.D., 2002. Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), pp.95–100.
- Kawaji, H. et al., 2006. Dynamic usage of transcription start sites within core promoters. *Genome biology*, 7(12), p.R118.
- Kim, Y.S. & Ho, S.B., 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12(5), pp.319–30.
- Kimura, T. et al., 2011. p2y5/LPA(6) attenuates LPA(1)-mediated VE-cadherin translocation and cell-cell dissociation through G(12/13) protein-Src-Rap1. *Cardiovascular research*, 92(1), pp.149–58.
- Kolasinska-Zwierz, P. et al., 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature genetics*, 41(3), pp.376–81.
- Kornblihtt, A.R. et al., 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(3), pp.153–65.
- Köttgen, M. et al., 2003. P2Y6 receptor mediates colonic NaCl secretion via differential activation of cAMP-mediated transport. *The Journal of clinical investigation*, 111(3), pp.371–9.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. & Vousden, K.H., 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630), pp.299–303.
- Le, K. et al., 2015. Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*, 36(10), pp.1212–8.
- Lee, D. et al., 2002. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 277(25), pp.22330–7.
- Lee, Y.I. et al., 2000. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 19(33), pp.3717–26.

- Levine, M. & Davidson, E.H., 2005. Gene regulatory networks for development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), pp.4936–42.
- Levine, M. & Tjian, R., 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424(6945), pp.147–51.
- Liu, K., Ling, S. & Lin, W.-C., 2011. TopBP1 mediates mutant p53 gain of function through NF-Y and p63/p73. *Molecular and cellular biology*, 31(22), pp.4464–81.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8.
- Lu, D. & Insel, P.A., 2014. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 306(9), pp.C779-88.
- Ludes-Meyers, J.H. et al., 1996. Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Molecular and cellular biology*, 16(11), pp.6009–19.
- Ludwig, R.L., Bates, S. & Vousden, K.H., 1996. Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Molecular and cellular biology*, 16(9), pp.4952–60.
- Maddox, S.A., Schafe, G.E. & Ressler, K.J., 2013. Exploring epigenetic regulation of fear memory and biomarkers associated with post-traumatic stress disorder. *Frontiers in psychiatry*, 4, p.62.
- Mager, J. et al., 2003. Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nature genetics*, 33(4), pp.502–7.
- Meek, D.W., 1999. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, 18(53), pp.7666–75.
- Moore, D.J. et al., 2001. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochimica et biophysica acta*, 1521(1–3), pp.107–19.
- Munro, A.J., Lain, S. & Lane, D.P., 2005. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *British Journal of Cancer*, 92(3), p.434.

- Naccarati, A. et al., 2012. Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2), pp.211–8.
- Nikulenkov, F. et al., 2012. Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell death and differentiation*, 19(12), pp.1992–2002.
- Nusse, R., 2005. Cell biology: relays at the membrane. *Nature*, 438(7069), pp.747–9.
- O’Brate, A. & Giannakakou, P., 2003. The importance of p53 location: Nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resistance Updates*, 6(6), pp.313–322.
- Pavletich, N.P., Chambers, K.A. & Pabo, C.O., 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes & development*, 7(12B), pp.2556–64.
- Pellegatti, P. et al., 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PloS one*, 3(7), p.e2599.
- Peterson, L.W. & Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 14(3), pp.141–53.
- Pfister, N.T. et al., 2015. Mutant p53 cooperates with the SWI/SNF chromatin remodeling complex to regulate VEGFR2 in breast cancer cells. *Genes & development*, 29(12), pp.1298–315.
- Potten, C.S. & Loeffler, M., 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)*, 110(4), pp.1001–20.
- Roberts, J.A. et al., 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 452(5), pp.486–500.
- de Rooij, J. et al., 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 396(6710), pp.474–7.
- Sarmiento, B., *Concepts and models for drug permeability studies : cell and tissue based In vitro culture models*,
- Schroeder, D.I. & Myers, R.M., 2008. Multiple transcription start sites for FOXP2 with varying cellular specificities. *Gene*, 413(1–2), pp.42–48.
- Seidel, E. (Edward R., 2006. *Gastrointestinal system*, Elsevier Mosby.
- Shaked, H. et al., 2008. Chromatin immunoprecipitation-on-chip reveals stress-dependent

- p53 occupancy in primary normal cells but not in established cell lines. *Cancer research*, 68(23), pp.9671–7.
- Smale, S.T. & Kadonaga, J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry*, 72, pp.449–79.
- Smeenk, L. et al., 2008. Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic acids research*, 36(11), pp.3639–54.
- Soong, R. et al., 2000. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 36(16), pp.2053–60.
- Staal, F.J.T. & Clevers, H.C., 2005. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nature reviews. Immunology*, 5(1), pp.21–30.
- staff, B. co. & staff, B. co., 2014. Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal of Medicine*, 1(2).
- Stommel, J.M. et al., 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO journal*, 18(6), pp.1660–72.
- Taussig, R., Iñiguez-Lluhi, J.A. & Gilman, A.G., 1993. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5118), pp.218–21.
- Tollefsbol, T.O., 2010. *Handbook of epigenetics : the new molecular and medical genetics*, Academic.
- Vleugel, M.M. et al., 2006. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human pathology*, 37(6), pp.668–74.
- Voloshanenko, O. et al., 2013. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nature communications*, 4, p.2610.
- Weinmann, A.S. & Farnham, P.J., 2002. Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods (San Diego, Calif.)*, 26(1), pp.37–47.
- Wells, J. & Farnham, P.J., 2002. Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods (San Diego, Calif.)*, 26(1), pp.48–56.

- West, N.R. et al., 2015. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature reviews. Immunology*, 15(10), pp.615–29.
- van de Wetering, M. et al., 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111(2), pp.241–50.
- Wilkins, J.F., 2005. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends in genetics : TIG*, 21(6), pp.356–65.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A., 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5439), pp.481–6.
- Zhou, L. et al., 2002. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *Journal of molecular biology*, 321(4), pp.591–9.
- Zhu, J. et al., 2000. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 275(51), pp.39927–34.
- Zhu, J. et al., 2015. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*, 525(7568), pp.206–11.

ANNEXES

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 14, 2016

This Agreement between Caroline Molle ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	3987750424430
License date	Nov 14, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature Reviews Immunology
Licensed Content Title	Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis
Licensed Content Author	Lance W. Peterson, David Artis
Licensed Content Date	Feb 25, 2014
Licensed Content Volume Number	14
Licensed Content Issue Number	3
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Expected completion date	Jan 2017
Estimated size (number of pages)	100
Requestor Location	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Caroline Molle
Billing Type	Invoice
Billing Address	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault

Sherbrooke, QC J1E 4K8
 Canada
 Attn: Caroline Molle

Total 0.00 CAD

Terms and Conditions

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
 For AOP papers, the credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 14, 2016

This Agreement between Caroline Molle ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	3987750980973
License date	Nov 14, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature Reviews Immunology
Licensed Content Title	WNT signalling and haematopoiesis: a WNT [ndash]]WNT situation
Licensed Content Author	Frank J.T. StaalandHans C. Clevers
Licensed Content Date	Jan 1, 2005
Licensed Content Volume Number	5
Licensed Content Issue Number	1
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	FIGURE 1 Overview of the WNT-signalling pathway.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULIERS LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Expected completion date	Jan 2017
Estimated size (number of pages)	100
Requestor Location	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Caroline Molle
Billing Type	Invoice
Billing Address	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8

Canada
Attn: Caroline Molle

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up

to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 15, 2016

This Agreement between Caroline Molle ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	3990331168813
License date	Nov 15, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature Reviews Immunology
Licensed Content Title	Emerging cytokine networks in colorectal cancer
Licensed Content Author	Nathan R. West, Sarah McCuaig, Fanny Franchini, Fiona Powrie
Licensed Content Date	Sep 11, 2015
Licensed Content Volume Number	15
Licensed Content Issue Number	10
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Box 1 Adenoma to carcinoma sequence
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULIERS LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Expected completion date	Jan 2017
Estimated size (number of pages)	100
Requestor Location	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Caroline Molle
Billing Type	Invoice
Billing Address	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8

Canada
Attn: Caroline Molle

Total 0.00 CAD

Terms and Conditions

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up

to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 15, 2016

This Agreement between Caroline Molle ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3990371223647
License date	Nov 15, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression
Licensed Content Title	Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study
Licensed Content Author	Darren J Moore,Jon K Chambers,Jean-Philippe Wahlin,Kong B Tan,Gary B Moore,Owen Jenkins,Piers C Emson,Paul R Murdock
Licensed Content Date	31 October 2001
Licensed Content Volume Number	1521
Licensed Content Issue Number	1-3
Licensed Content Pages	13
Start Page	107
End Page	119
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	French
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 1G
Title of your thesis/dissertation	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULIÈRES LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Expected completion date	Jan 2017
Estimated size (number of pages)	100
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault

Sherbrooke, QC J1E 4K8
Canada
Attn: Caroline Molle

Total 0.00 CAD

[Terms and Conditions](#)

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- after the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the

formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.8

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



Note: Copyright.com supplies permissions but not the copyrighted content itself.

1
PAYMENT

2
REVIEW

3
CONFIRMATION

Step 3: Order Confirmation

Thank you for your order! A confirmation for your order will be sent to your account email address. If you have questions about your order, you can call us 24 hrs/day, M-F at +1.855.239.3415 Toll Free, or write to us at info@copyright.com. This is not an invoice.

Confirmation Number: 11605874
Order Date: 11/16/2016

If you paid by credit card, your order will be finalized and your card will be charged within 24 hours. If you choose to be invoiced, you can change or cancel your order until the invoice is generated.

Payment Information

Caroline Molle
caroline.molle@usherbrooke.ca
+1 (819) 821-8000
Payment Method: n/a

Order Details

JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. ONLINE

Order detail ID: 70164517
Order License Id: 3990821092196

ISSN: 1558-8238
Publication Type: e-Journal

Volume:
Issue:

Start page:
Publisher: AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION

Permission Status: **Granted**

Permission type: Republish or display content
Type of use: Republish in a thesis/dissertation

Requestor type Academic institution

Format Electronic

Portion chart/graph/table/figure

Number of charts/graphs/tables/figures 1

Title or numeric reference of the portion(s) Figure 1 Effects of ATP and UDP on colonic ion transport.

Title of the article or chapter the portion is from P2Y6 receptor mediates colonic NaCl secretion via differential activation of cAMP-mediated transport

Editor of portion(s) N/A

Author of portion(s) N/A

Volume of serial or monograph	N/A
Page range of portion	371-379
Publication date of portion	february 1, 2003
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Canada
In the following language(s)	Original language plus one translation
Specific languages	French
With incidental promotional use	no
Lifetime unit quantity of new product	Up to 499
Made available in the following markets	education
The requesting person/organization	Caroline Molle
Order reference number	
Author/Editor	Caroline Molle
The standard identifier of New Work	Mémoire Maîtrise
Title of New Work	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Publisher of New Work	Université de Sherbrooke
Expected publication date	Jan 2017

Estimated size (pages) 100

Note: This item will be invoiced or charged separately through CCC's **RightsLink** service. [More info](#)

\$ 0.00

Total order items: 1

This is not an invoice.

Order Total: 0.00 USD

Confirmation Number: 11605874

Special Rightsholder Terms & Conditions

The following terms & conditions apply to the specific publication under which they are listed

JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. ONLINE

Permission type: Republish or display content

Type of use: Republish in a thesis/dissertation

TERMS AND CONDITIONS

The following terms are individual to this publisher:

None

Other Terms and Conditions:

STANDARD TERMS AND CONDITIONS

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.

2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.

3. Scope of License; Limitations and Obligations.

3.1 All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.

3.2 General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, Dept 001, P.O. Box 843006, Boston, MA 02284-3006. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.

3.3 Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

3.4 In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.

3.5 Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows:

"Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

3.6 User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.

5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.

6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8. Miscellaneous.

8.1 User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.

8.2 Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here: <http://www.copyright.com/content/cc3/en/tools/footer/privacypolicy.html>.

8.3 The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

8.4 No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

8.5 The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set

forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to info@copyright.com.

v 1.1

Close

Confirmation Number: 11605874

Citation Information

Order Detail ID: 70164517

**JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. ONLINE by AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION.
Reproduced with permission of AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION in the format Republish in a
thesis/dissertation via Copyright Clearance Center.**

Close

Thank you, the following information has been sent:	
Name	Caroline Molle
Institution	University of Sherbrooke
Address	3201, rue Jean Mignault
City State Zip	Sherbrooke, Québec, J1E4K8
Country	Canada
Phone	+18198218000
Fax	+18198218000
Email	caroline.molle@usherbrooke.ca
Article Title	Intestinal Inflammation Increases the Expression of the P2Y6 Receptor on Epithelial Cells and the Release of CXC Chemokine Ligand 8 by UDP
Volume	vol 180 no. 4
Range	2659-2668
Year	2008
DOI Number	10.4049/jimmunol.180.4.2659
Reproduction	yes
Modification	no
Fig/Table Number	FIGURE 1.
Other Production	
Author	no
Thesis	no
Publication Title	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Publisher	Université de Sherbrooke
Publication Date	
Comments	It will be used in a master thesis

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 16, 2016

This Agreement between Caroline Molle ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	3990870572347
License date	Nov 16, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth
Licensed Content Author	Jiajun Zhu, Morgan A. Sammons, Greg Donahue, Zhixun Dou, Masoud Vedadi, Matthias Getlik
Licensed Content Date	Sep 2, 2015
Licensed Content Volume Number	525
Licensed Content Issue Number	7568
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 2 GOF p53 mutants directly target chromatin regulators
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES LIÉS À P53 RÉGULANT L'EXPRESSION DE P2RY6
Expected completion date	Jan 2017
Estimated size (number of pages)	100
Requestor Location	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Caroline Molle
Billing Type	Invoice
Billing Address	Caroline Molle 3201, rue Jean Mignault

Sherbrooke, QC J1E 4K8
 Canada
 Attn: Caroline Molle

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
 For AOP papers, the credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
