

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1788

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

le 10 Décembre 2010

par VALBUZZI Thierry

né le 24 novembre 1982 à Trappes (78)

Rôle de la protéine HuR et de ses gènes cibles dans le carcinome hépatocellulaire

Membres du Jury

Mr GARBAY Bertrand

Professeur ESTBB, Université Bordeaux 2

Mme THERET Nathalie

Directeur de Recherche INSERM, Université Rennes 1

Mme ESPINOS Estelle

Maître de Conférences, Université Toulouse Purpan

Mr RIPOCHE Jean

Directeur de Recherche INSERM, Université Bordeaux 2

Mr SAGLIOCCO Francis

Maître de Conférences, Université Bordeaux 2

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1788

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

le 10 Décembre 2010

par VALBUZZI Thierry

né le 24 novembre 1982 à Trappes (78)

Rôle de la protéine HuR et de ses gènes cibles dans le carcinome hépatocellulaire

Membres du Jury

Mr GARBAY Bertrand

Professeur ESTBB, Université Bordeaux 2

Mme THERET Nathalie

Directeur de Recherche INSERM, Université Rennes 1

Mme ESPINOS Estelle

Maître de Conférences, Université Toulouse Purpan

Mr RIPOCHE Jean

Directeur de Recherche INSERM, Université Bordeaux 2

Mr SAGLIOCCO Francis

Maître de Conférences, Université Bordeaux 2

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

- Le professeur Bertrand GARBAY pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse*
- Mme Nathalie THERET, Directeur de Recherche, pour avoir accepté d'être le rapporteur de ce manuscrit*
- Mme Estelle Espinos, Maître de Conférences, pour avoir accepté d'être le rapporteur de ce manuscrit*
- Mr Jean RIPOCHE, Directeur de Recherche, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse*

Merci à Francis Sagliocco, Maître de Conférences, pour m'avoir encadré durant ces trois années de thèse.

Je tiens également à remercier Christophe GROSSET, Chargé de Recherche, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie Jean Rosenbaum, Directeur de Recherche, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire INSERM-U889.

Je tiens enfin à remercier tous les membres du Laboratoire pour leur aide et leur soutien.

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS	9
AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	11
I. LE CANCER DU FOIE	15
A. LE FOIE NON PATHOLOGIQUE	15
1. Anatomie et rôle du foie	15
2. Les différents types cellulaires du foie	16
a) Les hépatocytes	16
b) Les autres types cellulaires	17
B. LE CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE	17
C. FACTEURS ÉTIOLOGIQUES DU CHC.....	18
1. Le virus de l'hépatite B (VHB).....	19
2. Le virus de l'hépatite C (VHC).....	20
3. L'alcool.....	21
4. Obésité et diabète.....	22
5. Aflatoxine B1.....	24
D. L'HÉPATOGENÈSE.....	25
1. Mécanismes de l'hépatocarcinogénèse	25
2. Classification moléculaire des CHC	26
E. MÉCANISMES QUI ENTRAÎNENT UN CHANGEMENT D'EXPRESSION GÉNÉRIQUE DANS LE CANCER	27
F. RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE ET CANCER	29
II. RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE	31
A. RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE : GÉNÉRALITÉS	31
1. Maturation des pré-messagers.....	32
a) Addition de la coiffe.....	32
b) Mise en place de la queue poly(A) : polyadénylation.....	34
c) Épissage et épissage alternatif	36
(1) Mécanisme d'épissage.....	36
(2) Épissage alternatif.....	38
d) Édition.....	40
2. Devenir de l'ARNm.....	41
a) Traduction	41
b) Dégradation	43
(1) Dégradation déadénylation dépendante	43
(2) Dégradation déadénylation indépendante	45
(3) Dégradation par clivage endonucléolique.....	45
c) Localisation subcellulaire	46
3. Mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle	48
a) Contrôle qualité des ARNm	48
(1) Nonsense-mediated decay (NMD).....	48
(2) Non-stop decay (NSD)	50

(3) No-go decay (NGD)	50
b) Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes	51
c) Régulation par le 5'NT	53
(1) IRES	53
(2) Les Iron response element (IRE)	54
(3) Les upstream open reading frame (uORF)	56
d) Régulation par la phase codante	57
e) Régulation par le 3'NT	57
B. RÉGULATION PAR LES MIARNs	58
1. Biogénèse des miARNs	58
2. Mode d'action des miARNs	60
a) Répression de la traduction	61
b) Dégradation des ARNm	63
c) Interaction des miARN avec les RBPs	64
C. RÉGULATION PAR LES ÉLÉMENTS AU-RICHES (ARE)	65
1. L'élément cis : l'ARE	65
2. L'élément trans : les ARE-BPs	67
a) TIA1	68
b) AUF1	70
c) HuR	73
D. HuR ET CANCER	74
1. Structure	74
2. Modification post-traductionnelle et localisation sub-cellulaire d'HuR	75
3. Fonction	76
a) Promotion de la prolifération cellulaire	77
b) Résistance à l'apoptose	78
c) Augmentation de l'angiogénèse	80
d) Réduction de la réponse immunitaire	81
e) Promotion de l'invasion	82
4. Expression	83

OBJECTIFS87

MATÉRIELS ET MÉTHODES91

I. MATÉRIELS93

A. LIGNÉES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE	93
1. Lignées cellulaires	93
2. Milieux et conditions de culture	93
B. TISSUS HÉPATIQUES HUMAINS.....	94
C. ANTICORPS	95
D. OLIGONUCLÉOTIDES	96
E. siARNs.....	97
F. PUCES À ADN.....	97

II. MÉTHODES98

A. PRÉPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES ET TISSULAIRES	98
1. Préparation des extraits cellulaires	98
a) Extraction totale	98
b) Extraction cytoplasmique	98
c) Extraction nucléaire	99
2. Préparation des extraits tissulaires	99
B. ARN INTERFÉRENCE.....	100

C.	EXTRACTION D'ARN	100
D.	RT-PCR QUANTITATIVE	101
1.	Transcription inverse	101
2.	PCR quantitative	102
E.	WESTERN-BLOT	103
1.	Dosage protéique	103
2.	Préparation des échantillons	103
3.	Séparation des protéines	103
4.	Western-blot et immunodétection	104
5.	Coloration au Sypro Ruby	104
F.	MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	104
G.	IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA PROTÉINE HUR	105
1.	Préparation des billes de sépharose protéine G	105
2.	Immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques	106
H.	PUCES A ADN AFFYMETRIX	106
I.	ANALYSES BIOINFORMATIQUES	107
1.	Analyse statistique des données transcriptomiques	107
2.	Analyse ontologique	107
3.	Analyse statistique	108
RÉSULTATS 1		109
I.	PREMIÈRE STRATÉGIE	112
II.	DEUXIÈME STRATÉGIE	116
A.	ANALYSE DU TAUX DE PROTÉINES HUR, TIA1 ET AUF1 DANS LE CHC	116
B.	LA PROTÉINE AUF1 ET LE GLYPICAN3 (GPC3)	117
RÉSULTATS 2		121
I.	ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE HUR DANS LE CHC	123
A.	MISE AU POINT DE LA QUANTIFICATION D'HUR	123
B.	EXPRESSION DANS LES TISSUS HUMAINS	124
C.	ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	126
D.	EXPRESSION DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES	128
II.	EXPRESSION DE L'ARNm HUR DANS LE CHC	131
A.	CORRÉLATION D'EXPRESSION ENTRE LA PROTÉINE ET L'ARNm	131
B.	ANALYSE DES DONNÉES TRANSCRIPTOMIQUES	133
III.	IDENTIFICATION DES ARNm RÉGULÉS PAR HUR DANS LE CHC	136
A.	IDENTIFICATION DES CIBLES D'HUR	136
1.	Co-immunoprécipitation des ARNm associés à Hur	136
2.	Analyse des résultats d'hybridation sur puces des ARNm associés à Hur	139
3.	Analyse des données transcriptomiques	142
a)	Comparaison de nos données avec celles de la littérature	142
(1)	Niveau global	142
(2)	Niveau individuel	143
b)	Analyse ontologique	144

B.	IDENTIFICATION DES ARNm RÉGULÉS PAR HUR	149
1.	Diminution de l'expression d'HuR par ARN interférence.....	150
2.	Analyse transcriptomique des ARNm régulés par HuR.....	151
a)	Analyse globale	151
b)	Analyse ontologique.....	153
C.	CROISEMENT DES DONNÉES TRANSCRIPTOMIQUES.....	154
D.	EXTRAPOLATION DES DONNÉES CELLULAIRES À LA PATHOLOGIE HUMAINE	156
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		159
ANNEXE 1.....		169
ANNEXE 2.....		189
LISTES DES COMMUNICATIONS.....		197
BIBLIOGRAPHIE.....		201

ABRÉVIATIONS

3'NT	Région 3' Non Traduite
5'NT	Région 5' Non Traduite
A	Adénosine
ADN	Acide DésoxyRibonucléique
ARE	AU Rich Element
ARE-BP	ARE-Binding Protein
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
AUF1	AU-rich element RNA-binding protein 1
BSA	Bovine Serum Albumin
BMI	Body Mass Index
C	Cytosine
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CMV	CytoMégaloVirus
corps P	Processing bodies
CPE	Cytoplasmic Polyadenylation Element
CRD	Coding Region Determinant of instability
CRD-BP	CRD-Binding Proteins
DICE	Differential Control Element
DO	Densité Optique
Ecis	Eléments cis-régulateurs
EDEN	Embryonic deadenylation signal
Etrans	Eléments trans-régulateurs
EJC	Exon-exon Jonction Complex
ELAV	Embryonic Lethal, Abnormal Vision
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
Fc	Fold Change
G	Guanosine
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl Inositol
GTP	Guanosine TriPhosphate
hnRNP D	Heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein D
HNF	Hyperplasie Nodulaire Focale
HNS	HuR Nucleocytoplasmic Shuttling sequence
HuR	Hu antigen R
I	Inosine
IgG	Immunoglobuline
IRE	Iron Response Element
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRP	Iron Regulatory Protein
ISE	Intronic Splicing Enhancer
ISS	Intronic Splicing Silencer
ITAF	IRES Trans-Acting Factors
miARN	MicroARN

miRISC	miARN-Induced Silencing Complex
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NAS	Nonsense-mediated Alternative Splicing
NASH	Non Alcoholic SteatoHepatitis
NGD	No-Go Decay
NMD	Nonsense-Mediated Decay
NSD	Non-Stop Decay
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pré-ARNm	Précurseur de miARN
pri-miARN	miARN primaire
PTC	Premature Termination Codons
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
RBP	RNA-Binding Proteins,
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNAses	Ribonucléases
RNP	RiboNucléoProtéiques
RRM	RNA Recognition Motifs
Rpm	Rotation par minute
siARN	Small interfering ARN
snRNP	Small nuclear RiboNucleoProteins
T	Thymine
TIA-1	T-cell-restricted Intracellular Antigen-1
TIAR	TIA1 related
U	Uridine
uORF	Upstream Open Reading Frame
UV	Ultraviolet
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C

AVANT-PROPOS

Dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), l'expression de nombreux gènes est modifiée dans les cellules tumorales comparée aux cellules péri-tumorales. Des travaux récents ont montré que, dans le CHC, 40 à 50% des modifications d'expression génique ne seraient dues ni à des dysfonctionnements transcriptionnels, ni à des anomalies génomiques, mais pourraient découler d'une altération des mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle.

Mes travaux de thèse ont eu pour but de mieux comprendre les mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans la dérégulation des ARNm dans le CHC. Lors de ma première année de thèse, mon sujet consistait à caractériser les protéines fixées *in vivo* à ces ARNm. Pour cela, je devais mettre au point une approche de biologie moléculaire innovante, consistant à ajouter une étiquette ARN à un ARNm, pour pouvoir le purifier avec ses protéines associées *in vivo*. Une fois cette technique mise au point, mon attention se serait portée sur l'étude d'un ARNm présentant une dérégulation dans le CHC. Par comparaison entre une condition contrôle (ex : des cellules non tumorales) et une condition test (ex : des cellules tumorales), cette technique aurait peut-être permis d'identifier les acteurs protéiques impliqués dans cette dérégulation.

Au vu des difficultés expérimentales rencontrées, ce travail a été abandonné au bout d'une année. Au cours de ma deuxième année de thèse, j'ai initié un autre projet de recherche. Celui-ci, toujours dans la même thématique, s'intéresse aux protéines impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle. Dans un premier temps, l'expression de plusieurs RNA-binding proteins (RBPs) a été analysée dans des tissus hépatiques de patients atteints de CHC. J'ai ainsi pu montrer que 3 protéines, TIA1, AUF1 et HuR, sont surexprimées dans le CHC. La suite de mon projet s'est donc axée sur l'étude plus approfondie de deux d'entre elles, AUF1 et HuR, afin de déterminer le rôle joué par ces deux protéines dans la carcinogénèse hépatique. Des résultats préliminaires m'ont permis de mettre en évidence un lien

fonctionnel entre la protéine AUF1 et les ARNm CNX (calnexine) et ATF6 (activating transcription factor 6) codant pour des facteurs impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique, ainsi que l'ARNm du GPC3 (glypican 3) un marqueur pronostique du CHC. Concernant la protéine HuR, une approche plus globale a été utilisée visant à identifier l'ensemble des ARNm régulés par cette protéine dans le CHC.

Dans la suite de ce manuscrit, j'ai choisi de vous présenter le travail entrepris sur la protéine HuR.

INTRODUCTION

I. Le cancer du foie

A. Le foie non pathologique

1. Anatomie et rôle du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, puisqu'il représente 2% du poids corporel chez l'adulte, soit une moyenne de 1500 grammes. C'est un organe complexe impliqué dans de nombreuses fonctions vitales à l'organisme. Il joue un rôle central dans :

- Le métabolisme glucidique (maintien de la glycémie)
- Le métabolisme des lipides (synthèse des lipoprotéines et du cholestérol)
- Le métabolisme protéique par la biosynthèse de protéines plasmatiques (comme l'albumine et les facteurs de coagulation)
- La défense de l'organisme notamment en transformant les substances xénobiotiques (polluants, médicaments, alcool, etc.) et en permettant leur élimination
- Le stockage du fer et de nombreuses vitamines (A, D, B12)
- L'excrétion biliaire qui permet l'émulsion et la digestion des lipides ainsi que l'élimination de certains produits du métabolisme tels que le cholestérol et la bilirubine

Le foie est composé majoritairement de cellules hépatocytaires (environ 90% du volume hépatique). Ces cellules sont organisées en travées unicellulaires entre l'espace porte et la veine centrolobulaire (*Figure 1*). Le pôle sinusoidal des hépatocytes est séparé des cellules endothéliales par l'espace de Disse où ont lieu les échanges entre le sang et les hépatocytes. La surface basolatérale des hépatocytes comporte une structure spécifique, le canalicule biliaire, qui permet l'acheminement de la bile vers les canaux biliaires.

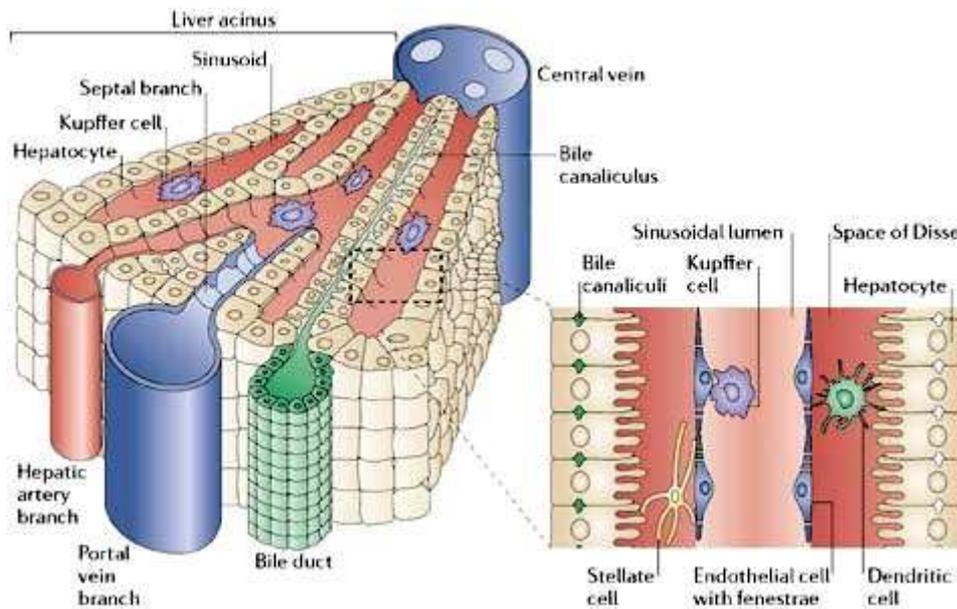


Figure 1 : Lobule hépatique (Adams and Eksteen 2006).

2. *Les différents types cellulaires du foie*

a) *Les hépatocytes*

Ce sont des cellules épithéliales polyédriques, de 20 μ m de large sur 30 μ m de long environ, comportant un noyau rond ou ovalaire central, parfois deux (environ 25% des hépatocytes sont binucléés). Les mitoses sont rares dans le foie adulte normal (une pour 10 000 à 20 000 hépatocytes) et la durée de vie moyenne d'un hépatocyte est de l'ordre de 150 jours. Les hépatocytes sont agencés en travées unicellulaires. Ils sont en contact avec les hépatocytes adjacents de la même travée par leurs membranes latérales, avec le canalicule biliaire par leur membrane canaliculaire, et avec l'espace de Disse par leur membrane sinusoidale. Les hépatocytes assurent de nombreuses fonctions métaboliques dont les principales sont la glycogénèse (synthèse du glycogène) et la glycogénolyse (dégradation du glycogène), la néoglucogénèse à partir des lipides, la sécrétion exocrine de bile et le traitement de nombreuses substances toxiques dont l'alcool (Blanc JF 2002).

b) Les autres types cellulaires

- Les cellules biliaires : plus petites que les hépatocytes, également d'origine épithéliale, bordent les voies biliaires intra- et extra-hépatiques.
- Les cellules endothéliales : ces cellules aplaties tapissent les capillaires sinusoides. Elles ont la particularité d'être fenêtrées, permettant les échanges entre le sang et les hépatocytes.
- Les cellules de Kupffer : ce sont des macrophages résidents du foie. Elles reposent sur la barrière endothéliale.
- Les lymphocytes associés au foie : ils constituent une population hétérogène de grands lymphocytes granulaires et agranulaires, et de petits lymphocytes. Ils sont en général situés dans la lumière des capillaires sinusoides et souvent en relation avec les cellules de Kupffer ou les cellules endothéliales.
- Les cellules étoilées du foie (CEF) : situées dans l'espace de Disse, elles ont un rôle dans le stockage de la vitamine A, dans la synthèse de la matrice extracellulaire et dans la régulation du flux sanguin sinusoidal.

B. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur maligne du foie qui se développe à partir des hépatocytes et représente 85 à 90% des cancers primitifs du foie. Il se place en cinquième position des cancers les plus fréquents au monde avec une incidence en constante augmentation (El-Serag and Rudolph 2007). Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a estimé en 2008 son incidence annuelle à 748 271 nouveaux cas dans le monde. Du fait d'un diagnostic tardif, c'est un cancer de très mauvais pronostic et il se situe en troisième position des causes de décès par cancer dans le monde. Le CHC peut survenir spontanément mais le plus souvent (70 à 90%) survient au terme d'une maladie chronique, qu'il s'agisse d'une hépatite virale B ou C devenue chronique, ou d'une cirrhose alcoolique (El-Serag and Rudolph 2007). Les atteintes du tissu hépatique (comme la cirrhose)

induisent une inflammation chronique à l'origine de cycles de nécrose/régénération des hépatocytes, d'apparition de cellules inflammatoires ainsi que de dépôts de tissu conjonctif et de collagène dans le foie. Ces modifications importantes, qui altèrent la matrice et le microenvironnement du foie, précèdent la survenue du CHC. Elles sont marquées par la présence de foyers d'hépatocytes phénotypiquement altérés et plus tard, d'hépatocytes dysplasiques sous forme de nodules qui peuvent évoluer vers le CHC (**Figure 2**) (Farazi and DePinho 2006).

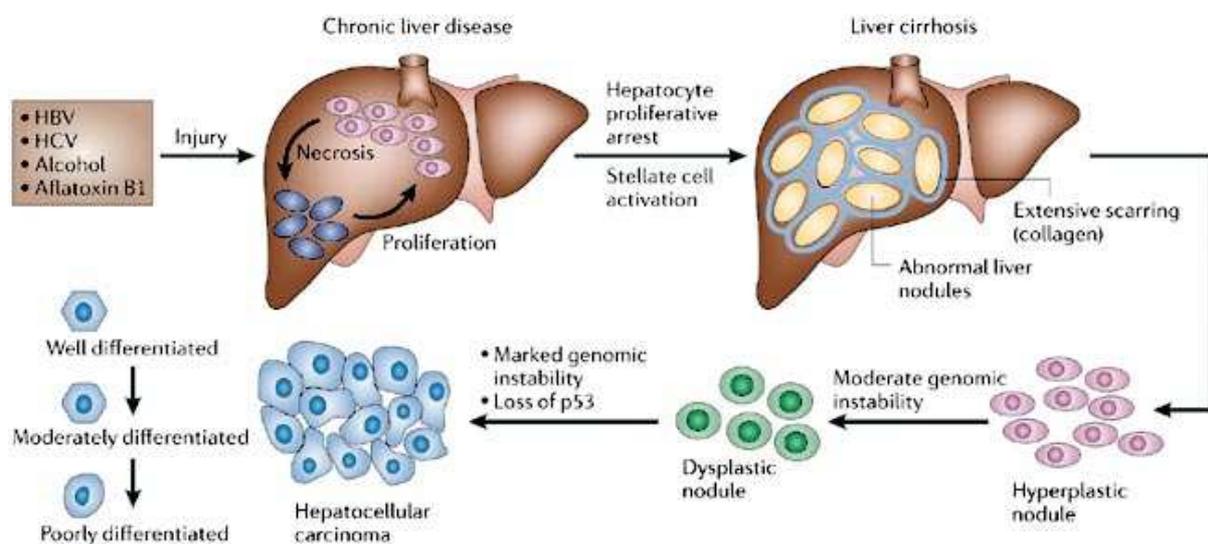


Figure 2: Progression histopathologique du foie vers le CHC (Farazi and DePinho 2006).

C. Facteurs étiologiques du CHC

Les facteurs étiologiques du CHC sont très variables suivant les zones géographiques. Dans les zones à haut risque de CHC comme l'Asie du sud-est et l'Afrique sub-saharienne, l'infection par le virus de l'hépatite B est la principale cause de survenue d'un CHC. L'infection par le virus de l'hépatite C devient la principale cause de CHC dans les régions à moyenne incidence comme l'Europe du sud. Et enfin dans les zones à faible risque comme l'Europe du nord ou les Etats-Unis, le CHC est souvent dû à d'autres facteurs comme l'alcool et de plus en plus aux syndromes dysmétaboliques (diabète, obésité, etc...). Sont représentées dans la

figure suivante (*Figure 3*) les estimations de l'incidence du cancer du foie dans le monde.

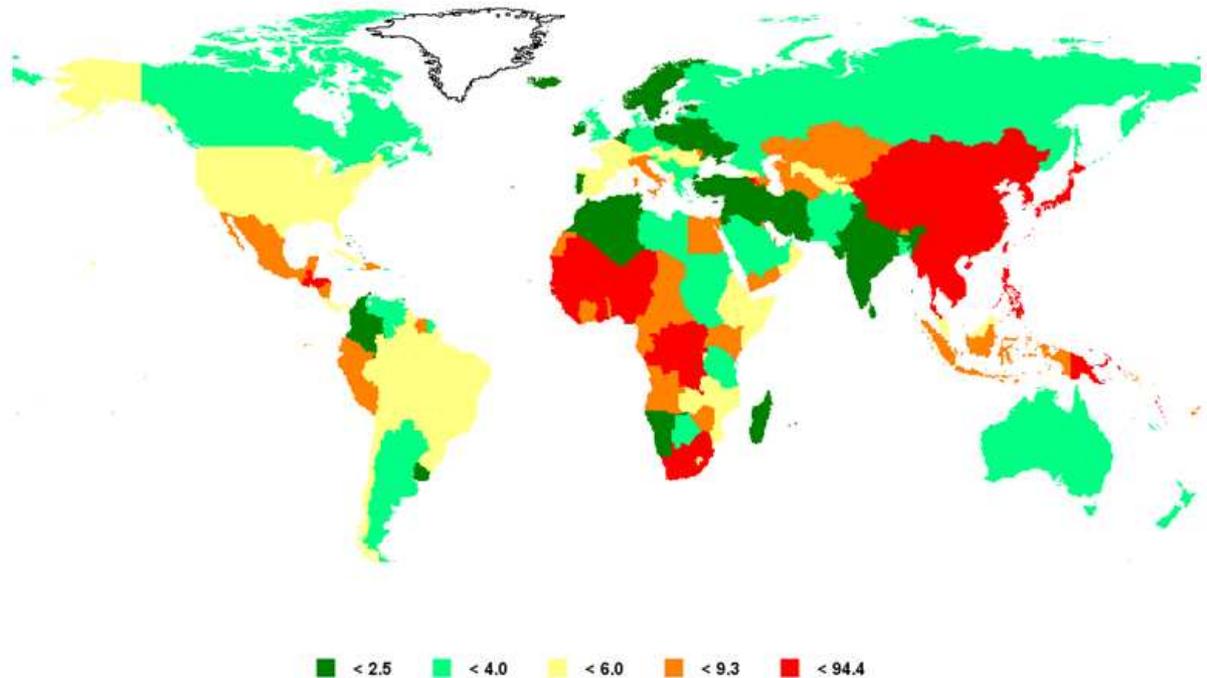


Figure 3: Estimations de l'incidence du cancer du foie dans le monde. Les taux sont standardisés pour 100 000 personnes (hommes et femmes de tous âges). <http://globocan.iarc.fr/>

1. *Le virus de l'hépatite B (VHB)*

On estime à ce jour à environ 350 millions le nombre de personnes qui sont infectées de façon chronique par le VHB. Le risque de développer un CHC chez ces individus est 5 à 15 fois plus important par rapport à des individus non infectés (El-Serag and Rudolph 2007). Les processus induisant la transformation maligne ne sont pas encore bien connus, cependant trois mécanismes ont été proposés (Pang, Tse et al. 2006) :

- Une instabilité chromosomique provoquée par l'insertion de l'ADN viral dans le génome des cellules hépatocytaires

- Une altération de l'expression de certains gènes (contrôlant la prolifération cellulaire, les mécanismes de viabilité et de différenciation) provoquée par des mutations insertionnelles résultant de l'intégration du génome du VHB
- Une modulation de la prolifération cellulaire induite par l'expression de la protéine virale transactivatrice HBx, capable entre autres d'activer la transcription de gènes liés à la prolifération cellulaire

En dehors de ces mécanismes spécifiques, une infection par le VHB, souvent associée à une cirrhose, induit une inflammation chronique du foie entraînant des cycles de nécrose/régénération des hépatocytes pouvant favoriser les altérations génétiques et la survenue du cancer. La meilleure façon de se protéger de ce virus est de se faire vacciner.

2. Le virus de l'hépatite C (VHC)

En 2000, l'OMS estimait à environ 170 millions le nombre de porteurs chroniques du VHC dans le monde, et à 3 à 4 millions le nombre de personnes nouvellement infectées chaque année. Chez ces personnes le risque de développer un CHC est augmenté de 11,5 à 17 fois (Francesco, Paolo et al. 1998; Donato, Tagger et al. 2002). Le VHC est un virus à ARN qui ne s'intègre pas dans le génome des hépatocytes, contrairement au virus de l'hépatite B. Les interactions entre les protéines virales et les protéines de la cellule hôte semblent être les principaux mécanismes conduisant à la carcinogenèse hépatique. La plupart des études menées sur les processus de la carcinogenèse induits par le VHC ont été réalisées sur la protéine structurale core (HCV core), qui joue un rôle important en agissant sur la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Tsai and Chung 2010). Une autre particularité qui le différencie du virus de l'hépatite B est sa plus grande capacité à provoquer une infection chronique et une cirrhose. Effectivement, 90% des individus infectés par le VHC développent une hépatite chronique et 25 à 30 ans après l'infection, 10 à 30% développent une cirrhose. Une fois la cirrhose établie, le risque de CHC est de 1 à 3% par an (**Figure 4**) (El-Serag and Rudolph 2007).

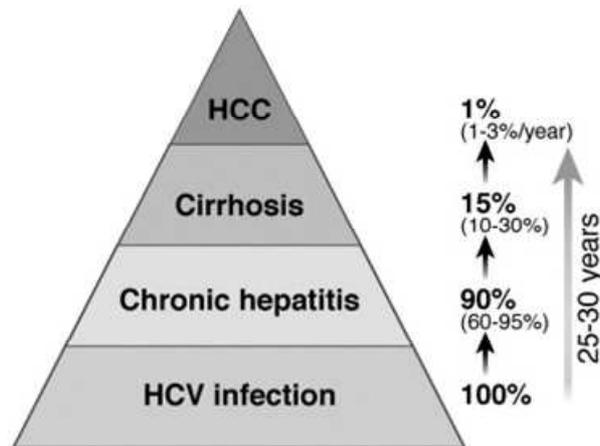


Figure 4: Proportion de patients avec un CHC en relation à une infection par le VHC (El-Serag and Rudolph 2007).

3. *L'alcool*

L'alcool contribue largement au développement du CHC en Amérique du nord et en Europe de l'ouest, et sa contribution augmente en Asie. Le mécanisme le plus probable, responsable de l'apparition du CHC serait le développement d'une fibrose hépatique et une production de cytokines pro-inflammatoires entraînant des cycles de nécrose/régénération des hépatocytes. Parallèlement, les cellules étoilées du foie sont activées et produisent de la matrice extracellulaire favorisant la mise en place de dépôts de collagène dans le foie lésé. Cet état chronique conduit à l'apparition d'une cirrhose et ultérieurement à celle du CHC.

D'autres événements peuvent également avoir un rôle dans la carcinogenèse comme un changement du métabolisme hépatique. La métabolisation de l'éthanol dans le foie se traduit par la formation de molécules toxiques pour les tissus et très réactives comme l'acétaldéhyde et des radicaux libres qui sont capables, entre autres, de changer le potentiel redox du foie. La conséquence est une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ dans le cytosol et les mitochondries des hépatocytes, perturbant ainsi de nombreuses réactions métaboliques, entraînant à terme une

altération du métabolisme des lipides, des carbohydrates, des protéines, du lactate et de l'acide urique (Samir and Ting-Kai 2007).

La consommation d'alcool peut également agir de façon synergique avec une infection par le virus de l'hépatite (B ou C) dans le développement d'un CHC (**Figure 5**) (Morgan, Mandayam et al. 2004).

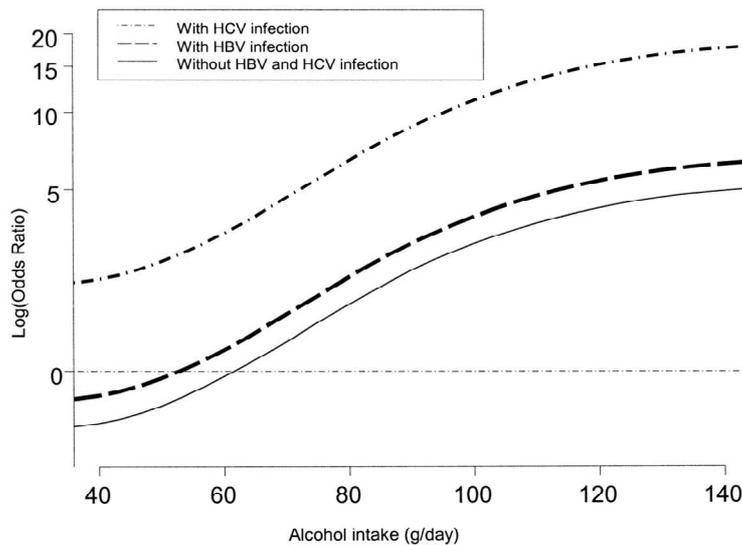


Figure 5: Ratios de CHC en relation avec la consommation d'alcool et l'infection par le VHB ou le VHC (Donato, Tagger et al. 2002).

4. **Obésité et diabète**

L'obésité et le diabète augmentent le risque de développer un CHC (Starley, Calcagno et al. 2010). Plusieurs études menées sur des populations différentes (danoises, américaines et coréennes) ont montré que le risque de développer un CHC était en moyenne 2 fois plus important chez les individus ayant un indice de masse corporelle supérieur à 30-35 Kg/m² comparé à ceux ayant un indice normal (Møller, Møller et al. 1994; Calle, Rodriguez et al. 2003; Oh, Yoon et al. 2005) (**Figure 6**).

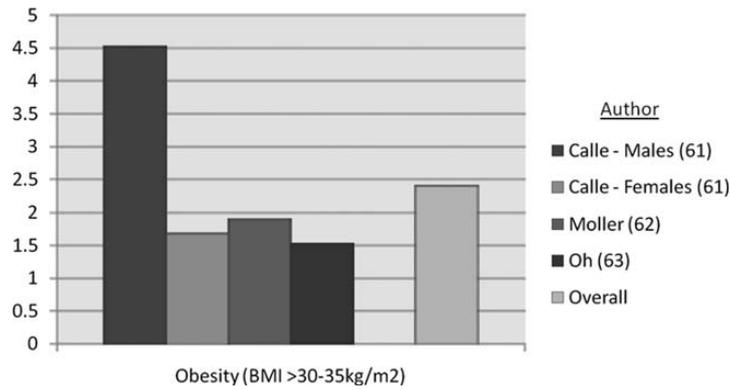


Figure 6 : Risque relatif de développer un CHC avec l'obésité (Starley, Calcagno et al. 2010).

En ce qui concerne le diabète, plusieurs études menées sur une cohorte de patients d'Europe de l'ouest et d'Amérique du nord ont montré que des personnes atteintes de diabète ont en moyenne 2,5 fois plus de risque de développer un CHC que des patients non atteints (Adami, Chow et al. 1996; Wideroff, Gridley et al. 1997; Lagiou, Kuper et al. 2000; El-Serag, Richardson et al. 2001) (Figure 7).

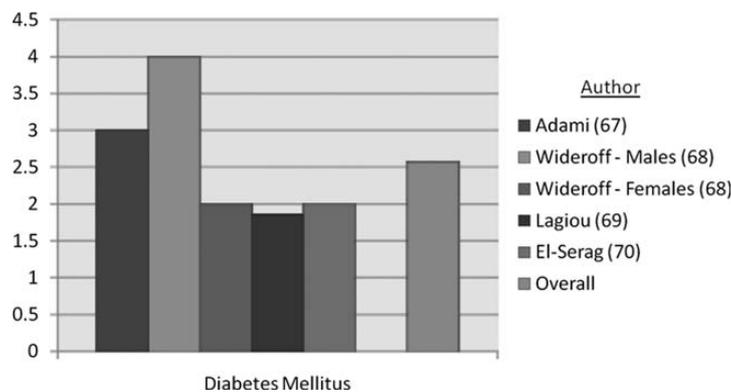


Figure 7 : Risque relatif de développer un CHC avec un diabète (Starley, Calcagno et al. 2010).

Ces atteintes métaboliques entraînent une production élevée de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui aboutissent à l'accumulation d'acides gras libres dans le foie (Starley, Calcagno et al. 2010). Cette accumulation de lipides dans le foie, appelée stéatose hépatique est définie sous le nom de NAFLD (Non-Alcoholic

Fatty Liver Disease). Cette pathologie peut se compliquer et induire une inflammation chronique, NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis), puis une cirrhose et un CHC (*Figure 8*).

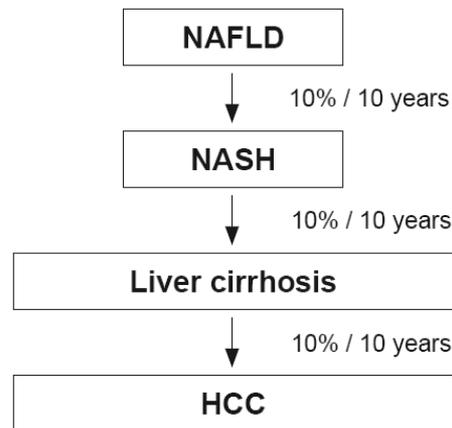


Figure 8 : Évolution de la NAFLD vers le CHC

5. *L'Aflatoxine B1*

L'aflatoxine B1 est une mycotoxine produite par des champignons (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) qui contaminent les graines d'arachide et diverses céréales (maïs, riz, blé, etc.), nourriture de base dans de nombreux pays en voie de développement. Ce champignon se développe dans une atmosphère chaude et humide, essentiellement en Afrique sub-saharienne et en Asie. Les mauvaises conditions de stockage des récoltes favorisent son développement. Après ingestion, cette mycotoxine est préférentiellement assimilée par le foie qui va la modifier en un produit toxique responsable de lésions au niveau de l'ADN génomique des cellules hépatiques. Ce sont ces lésions génomiques qui augmentent le risque de développer un CHC.

Les zones où l'exposition à l'aflatoxine est très importante possèdent également une forte prévalence à l'infection par le VHB. Bien que l'exposition à l'aflatoxine seule soit un facteur de risque significatif pour le développement du CHC, son association

avec une infection au VHB augmente de 60 fois la survenue d'un CHC (Qian, Ross et al. 1994).

D. L'hépatocarcinogénèse

1. Mécanismes de l'hépatocarcinogénèse

Comme vu précédemment, l'évolution vers le CHC répond à un processus multi-étapes accompagnant l'exposition à différents facteurs de risque. Ces différents facteurs de risque peuvent affecter des voies de signalisation communes. C'est le cas par exemple du gène suppresseur de tumeur p53 qui peut être inactivé ou muté dans les CHC induits par le VHB, le VHC et l'aflatoxine B1. D'autre part, une inflammation accompagnée de cycles continus de nécrose/régénération et la présence d'un stress oxydatif sont caractéristiques de l'hépatocarcinogénèse induites par le VHB, le VHC et l'alcool (**Figure 9**) (Farazi and DePinho 2006). Actuellement, les mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse ne sont pas très clairs, et ceci est dû principalement aux causes multifactorielles de ce cancer. Cependant, il est possible d'identifier un ensemble d'altérations spécifiques au CHC.

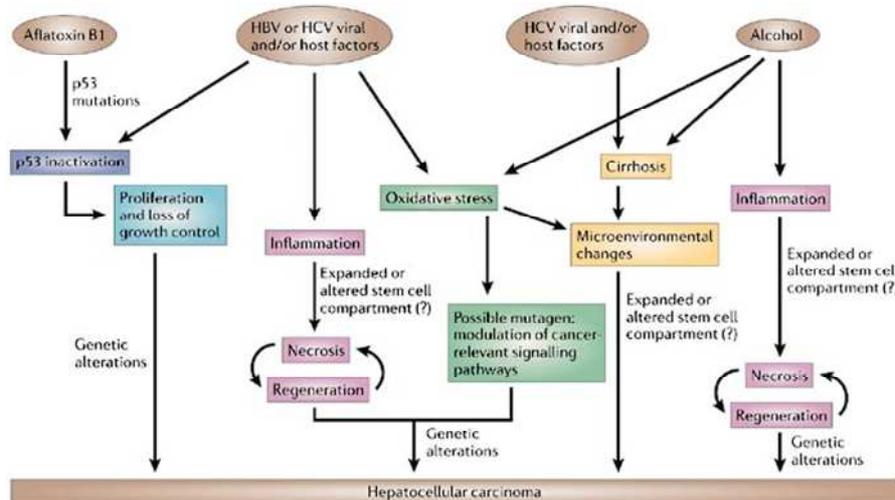


Figure 9: Mécanismes de l'hépatocarcinogénèse (Farazi and DePinho 2006).

2. Classification moléculaire des CHC

Une analyse transcriptomique globale réalisée sur une grande série de CHC, associée aux données clinico-pathologiques, a permis d'établir une classification qui reflète la grande diversité des régulations génétiques et épigénétiques acquises durant la progression tumorale (**Figure 10**) (Boyault, Rickman et al. 2007).

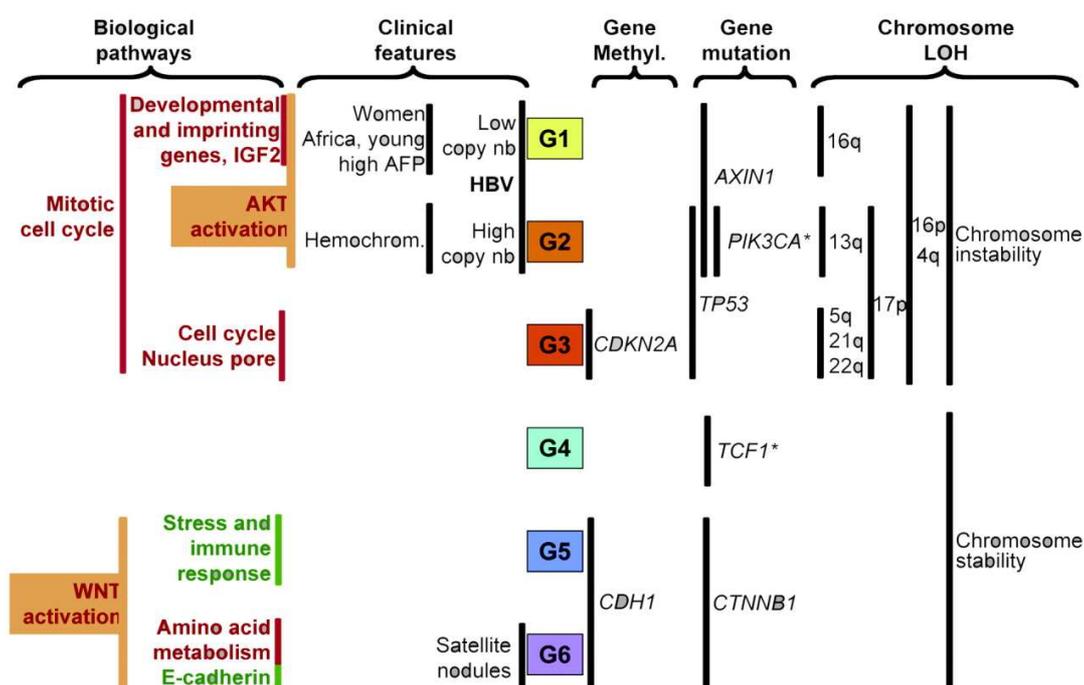


Figure 10 : Représentation schématique des différents sous-groupes de CHC (Boyault, Rickman et al. 2007).

Une première approche, basée sur la recherche systématique de pertes d'hétérozygotie et l'analyse de 335 marqueurs d'altérations génétiques, a permis de classer les CHC en deux groupes principaux : l'un lié à l'instabilité chromosomique et fréquemment associé aux mutations de TP53 et de l'Axine1, et à l'infection par le VHB avec des tumeurs de mauvais pronostic, l'autre lié à une stabilité chromosomique et souvent associé aux mutations activatrices de la β -caténine (Laurent-Puig, Legoix et al. 2001).

Cette classification a ensuite été affinée, faisant notamment apparaître 6 sous-groupes de tumeurs caractérisés par leur profil transcriptomique correspondant à des voies de carcinogénèse spécifique comme par exemple l'activation de la voie Akt, la dérégulation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le pore nucléaire en ce qui concerne les CHC présentant une instabilité génétique (**Figure 10**) (Boyault, Rickman et al. 2007).

E. Mécanismes qui entraînent un changement d'expression génique dans le cancer

En plus des altérations structurales des gènes, comme les mutations activatrices d'oncogènes ou les mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs, plusieurs études transcriptomiques ont pu mettre en évidence que le taux d'ARNm de plusieurs centaines de gènes sont modifiés dans les tumeurs (Graveel, Jatkoe et al. 2001; Xu, Hui et al. 2001; Chen, Cheung et al. 2002; Delpuech, Trabut et al. 2002; Lee and Thorgerirsson 2002; Boyault, Rickman et al. 2007; Su, Chao et al. 2007). La plupart des gènes surexprimés dans les tumeurs sont des ribonucléoprotéines, ce qui suggère que la machinerie de synthèse protéique est exacerbée dans les tumeurs. A l'inverse, les gènes impliqués dans le métabolisme du foie sont plutôt sous-exprimés (Acevedo, Bieda et al. 2008) (**Figure 11**).

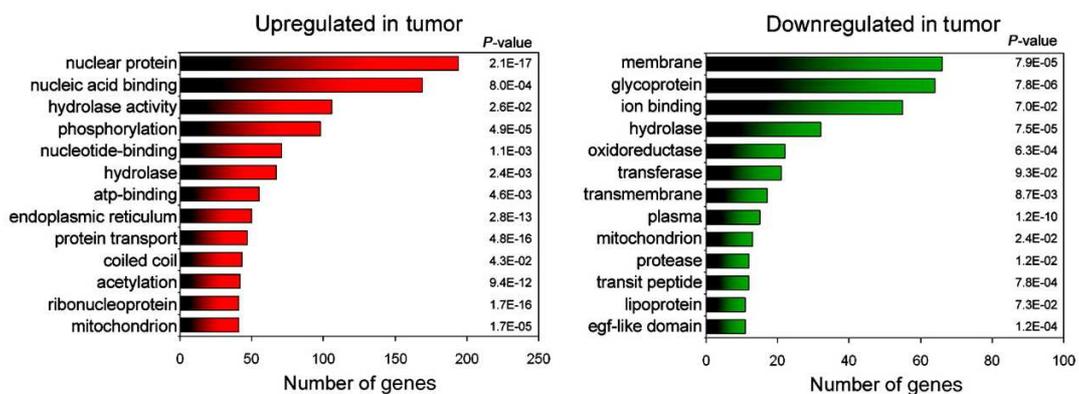


Figure 11 : Analyse par « gene ontology » des gènes sous-exprimés et surexprimés dans le CHC (Acevedo, Bieda et al. 2008).

Une étude menée en 2008 a tenté d'expliquer les mécanismes responsables du changement d'expression génique dans le CHC par des analyses ChIP-chip (Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip) et CGH (Comparative Genomic Hybridization) réalisées sur des extraits de tissus humains atteints de CHC en comparaison avec des tissus issus de la périphérie de la tumeur (Acevedo, Bieda et al. 2008). Il ressort de cette étude que les mécanismes transcriptionnels, comme la formation du complexe de préinitiation ou le silencing de la chromatine, n'influencent que faiblement la dérégulation de l'expression génique observée dans le CHC. Cela concerne 9% des gènes surexprimés et 18% des gènes sous-exprimés dans le CHC. En revanche, le changement d'expression, pour 53% et 33% des gènes surexprimés et sous-exprimés dans le CHC, est le résultat direct de la modification de leur nombre de copies (*Figure 12*).

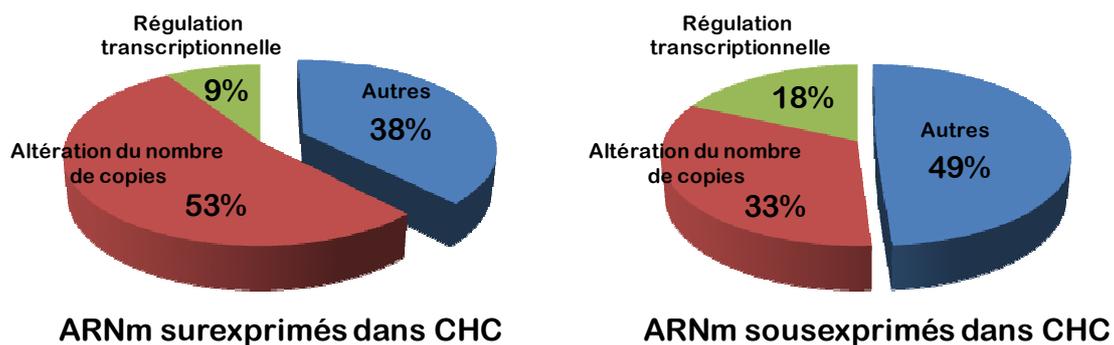


Figure 12: Mécanismes responsables des changements d'expression des gènes dans le CHC. Adapté de (Acevedo, Bieda et al. 2008).

Cependant, entre 38% et 49% des gènes surexprimés ou sous-exprimés dans le CHC ne sont régulés par aucun de ces mécanismes. Ceci pourrait s'expliquer par une altération des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

Les résultats d'analyses réalisées ces dernières années (Anderson, Phillips et al. 2004; Lopez de Silanes, Quesada et al. 2007; Nguyen-Chi and Morello 2008) soulignent l'importance de ces dérégulations en pathologie humaine, en particulier dans le cancer. La communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux liens qui pourraient exister entre cancer et dérégulations post-transcriptionnelles (Audic and

Hartley 2004; Ladeiro, Couchy et al. 2008). C'est sur cet aspect que je développerai la suite de mon manuscrit.

F. Régulation post-transcriptionnelle et cancer

Avant d'aborder en détail les grandes étapes de la régulation post-transcriptionnelle, je présenterai de façon générale l'implication que peut avoir ce type de régulation dans le cancer. Des exemples plus précis montrant le rôle important de cette régulation dans le cancer seront abordés tout au long du chapitre suivant.

La dérégulation de l'expression génique est une des caractéristiques des cellules cancéreuses. L'acquisition d'un nouveau profil d'expression protéique permet à la cellule de ré-entrer dans le cycle cellulaire, et leur donner un avantage prolifératif ou de motilité sur les cellules normales. Un moyen de modifier l'expression des gènes est de réguler cette expression au niveau post-transcriptionnel. Les modifications de la stabilité et/ou de l'efficacité de traduction des ARNm sont de plus en plus répertoriées dans le cancer (Audic and Hartley 2004; Lopez de Silanes, Lal et al. 2005; Lopez de Silanes, Quesada et al. 2007; Nguyen-Chi and Morello 2008).

Les oncogènes, définis comme des gènes capables d'induire des caractéristiques spécifiques de cellules cancéreuses dans des cellules normales, codent pour de nombreux facteurs comme des kinases, des récepteurs, des facteurs de croissance, des cytokines, des régulateurs du cycle cellulaire ou des facteurs de transcription. Dans la plupart des tumeurs, les transcrits codant pour des oncogènes sont stabilisés (Benjamin and Moroni 2007), ce qui entraîne une surproduction de protéines et une prédisposition à une division cellulaire intense. Cette stabilisation peut être la conséquence ou la cause de la transformation en cellule cancéreuse. La modification de la stabilité ou de l'efficacité de traduction d'un ARNm est contrôlée à travers un réseau complexe d'interactions ARN/protéines.

En effet, cette régulation contrôle le devenir de l'ARNm dans la cellule par l'intermédiaire d'interactions entre des composants intrinsèques structuraux de

l'ARNm, les éléments *cis*, et des facteurs *trans*-régulateurs spécifiques. Ces facteurs régulateurs peuvent être des protéines se liant à l'ARN (ou RNA binding proteins, RBPs) ou des petits ARNs non codants (microARNs, endo-small interfering RNAs...) (Moore 2005; Garneau, Wilusz et al. 2007; Wu and Belasco 2008). Toute modification anormale de ces composants est susceptible d'entraîner des défauts fonctionnels et conduire à des pathologies. Ces modifications peuvent avoir pour origine des mutations ou des délétions de la séquence *cis*, mais également des variations d'expression, de localisation subcellulaire ou de fonctionnalité (suite à une variation de phosphorylation par exemple) des facteurs *trans* (Audic and Hartley 2004) (**Figure 13**).

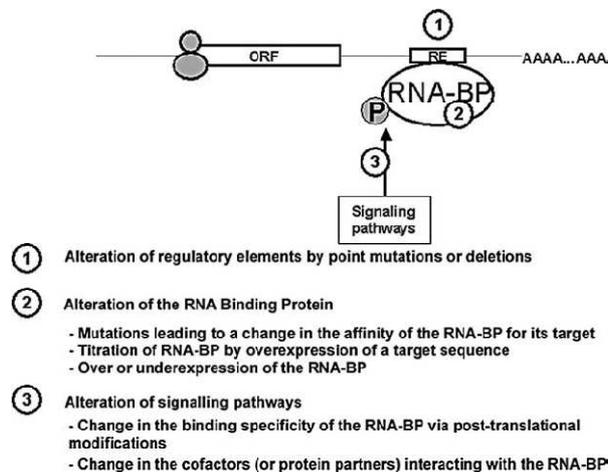


Figure 13 : Mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et leurs modifications dans le cancer (Audic and Hartley 2004).

Mieux connaître les bases moléculaires des régulations post-transcriptionnelles et l'origine de leur altération fonctionnelle pourrait permettre de mieux appréhender l'impact d'une dérégulation de ces mécanismes sur l'expression des gènes correspondants et leur implication dans certaines pathologies comme le cancer. *In fine*, ces connaissances pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

II. Régulation post-transcriptionnelle

A. Régulation post-transcriptionnelle : généralités

Les régulations post-transcriptionnelles font appel à des mécanismes basés sur de nombreuses interactions moléculaires entre l'ARNm et les facteurs *trans* s'y associant (Moore 2005). Elles peuvent être résumées de façon simple par les étapes suivantes : la maturation du pré-ARNm, l'export nucléo-cytoplasmique de l'ARNm et la vérification de son intégrité moléculaire (surveillance de l'ARN), le contrôle de sa demi-vie, de sa localisation subcellulaire (incluant son stockage) et de son efficacité à être traduit en protéine (**Figure 14**).

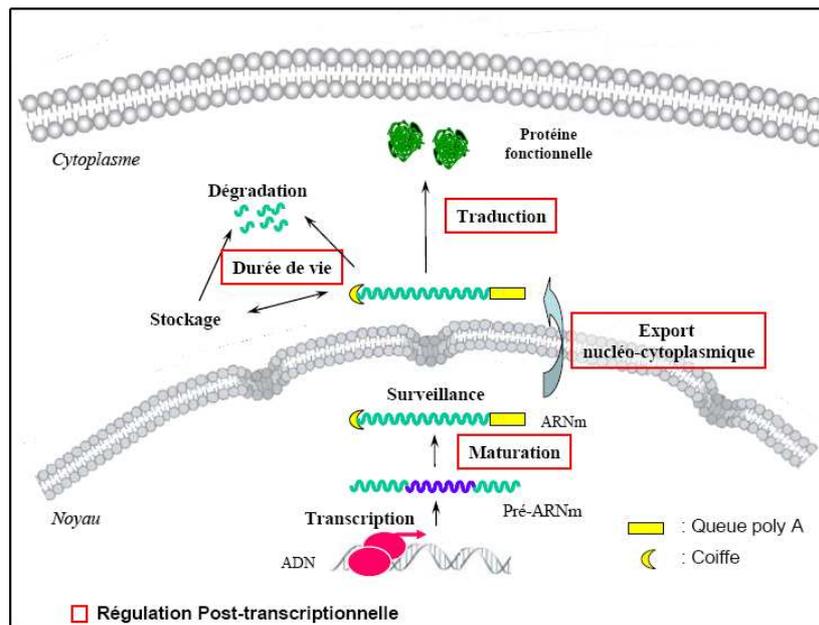


Figure 14 : Schéma simplifié de la régulation post-transcriptionnelle d'un gène.

Chacune de ces étapes doit être régulée de façon précise, car la moindre anomalie peut avoir des conséquences importantes sur l'expression du gène correspondant. Les mécanismes fondamentaux de cette régulation sont difficiles à étudier du fait de la présence de nombreux motifs structuraux (éléments *cis*) dans

l'ARNm (Ross 1995; Guhaniyogi and Brewer 2001) et du nombre important de facteurs *trans*-régulateurs (RBPs et petits ARNs non codants) capables de s'associer à ces motifs.

Dans la suite de ce chapitre je décrirai les grandes étapes de la régulation post-transcriptionnelle.

1. *Maturation des pré-messagers*

Le transcrit primaire (pré-ARNm) doit subir diverses modifications avant de devenir pleinement fonctionnel pour son export cytoplasmique et sa traduction. Ces modifications, également appelées maturation de l'ARN, sont un ensemble de mécanismes qui transforment la structure du transcrit primaire ou pré-ARNm en sa forme définitive, l'ARNm mature.

a) *Addition de la coiffe*

La première étape de cette maturation est l'ajout de la coiffe en 5' du transcrit naissant qui consiste en la fixation d'un groupement 5'N7-méthyl guanosine sur le premier nucléotide via une liaison 5'-5' triphosphate (**Figure 15**).

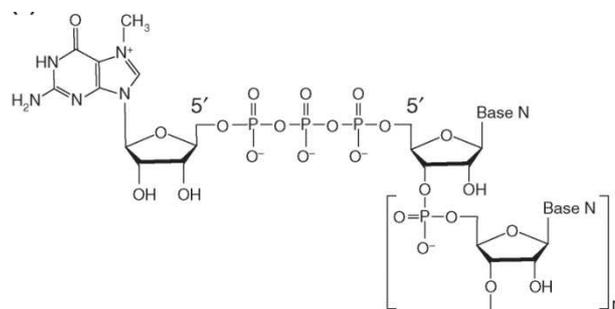


Figure 15: Structure de la coiffe (Gu and Lima 2005).

La formation de la coiffe s'effectue au début de la transcription avant que la chaîne ne compte plus de 30 nucléotides, par une série de trois réactions enzymatiques (Gu and Lima 2005). Le premier nucléotide du transcrit est généralement une base purique (A ou G) qui comporte un groupement triphosphate en 5' (pppNp). La première étape est le clivage de l'extrémité 5'-triphosphate de l'ARN précurseur par une triphosphatase, laissant ainsi une extrémité 5'-diphosphate libre (ppNp). Ensuite une guanylyltransférase ajoute un groupement guanine mono phosphate (GMP) pour donner une extrémité GpppNp. Enfin, l'extrémité 5'-guanine nouvellement formée est méthylée en position N7 par une guanine-N7-méthyltransférase, et ainsi donner la coiffe finale $m^7\text{GpppNp}$ (Figure 16).

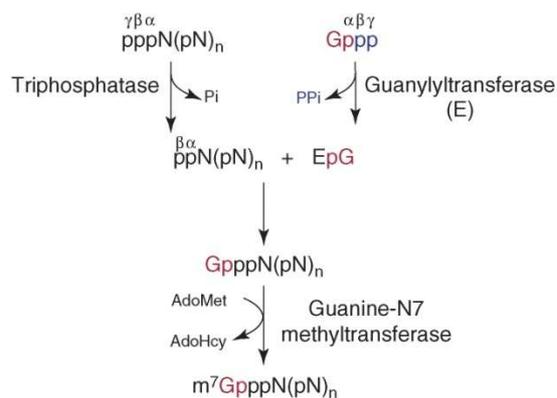


Figure 16: Synthèse de la coiffe (Gu and Lima 2005).

La coiffe est un motif essentiel dans la vie des ARNm eucaryotes. Elle permet de stabiliser l'ARNm en protégeant l'extrémité 5' des activités 5'-3' exoribonucléasiques cellulaires, de faciliter l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm et de jouer un rôle important dans la traduction des transcrits en recrutant le facteur eIF4F (eucaryotic initiation factor 4F) qui est un facteur limitant dans l'initiation de la traduction (Cowling 2009).

b) Mise en place de la queue poly(A) : polyadénylation

La deuxième étape de maturation des pré-ARNm consiste en l'ajout à l'extrémité 3' d'une queue poly(A). Pour ce faire, un clivage endonucléolytique se produit à l'extrémité 3' des pré-ARNm, laissant ensuite la place à l'ajout de nombreux résidus adénosine (A). La formation de cette queue de polyadénosines est dirigée par un signal de polyadénylation composé de trois séquences (**Figure 17**) : une séquence hexanucléotidique hautement conservée AAUAAA située à 10-30 bases en amont du site de clivage, un motif riche en U ou en G/U positionné 20-40 bases en aval du site de clivage et le site de clivage constitué du dinucléotide CA.

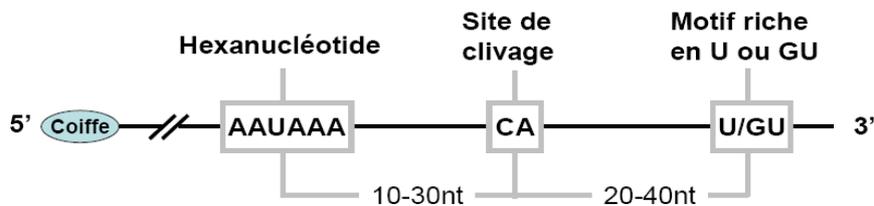


Figure 17: Signal de polyadénylation (Parent and Bisailon 2006).

En plus du signal de polyadénylation, cette maturation de l'extrémité 3' nécessite l'intervention d'au moins 6 facteurs polymériques. Le complexe protéique CPSF (Cleavage Polyadenylation Specific Factor) qui se lie à l'hexanucléotide AAUAAA et qui participe à la fois à la réaction de clivage et à celle de polyadénylation. Le complexe CstF (Cleavage Stimulation Factor) se fixe à la séquence riche en U/GU et participe également au clivage. L'ARN polymérase II (Pol II) par son extrémité carboxyterminale (CTD) fait également partie de la machinerie de polyadénylation. Ces associations ARN/protéines permettent ensuite le recrutement de deux endonucléases CFI et CFII (Cleavage Factor I/II) au niveau du site de clivage. Pour finir, la PAP (Poly(A) Polymérase) complète le complexe. Une fois le complexe formé, la coupure du pré-ARNm se fait au niveau du dinucléotide CA, entraînant ainsi la libération des facteurs CstF, CFI et CFII. L'activité de polyadénylation de PAP débute alors à l'extrémité 3' libre en ajoutant des résidus adénosine. La PABP II

(Poly(A) Binding Protein II) s'associe ensuite à chaque groupe de 10 résidus d'adénosine nouvellement synthétisé, permettant une accélération de l'activité de la polymérase (Kuhn, Gundel et al. 2009). Une fois la longueur maximale de la queue poly(A) atteinte, environ 200 à 300 résidus adénosine chez l'homme, l'activité de PAP ralentit et s'arrête complètement lors de la dissociation du complexe PAP-CPSF (*Figure 18*).

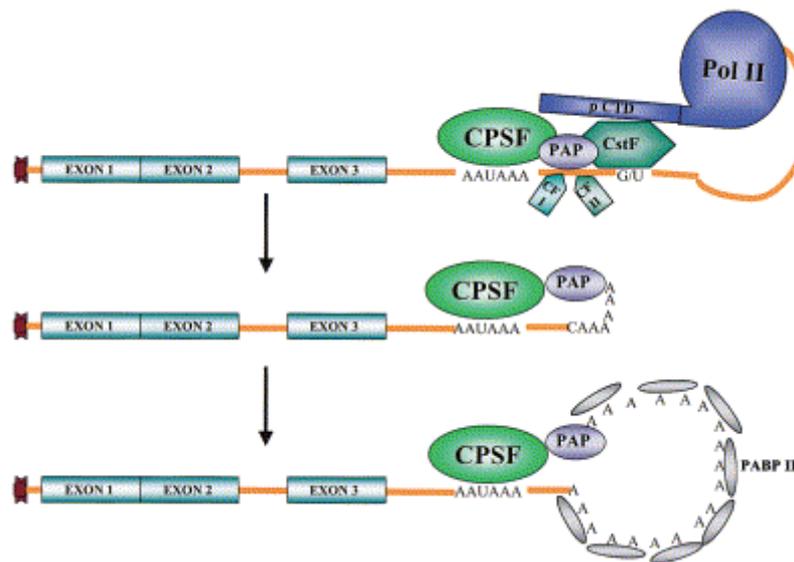


Figure 18: Mécanisme de polyadénylation (Proudfoot, Furger et al. 2002).

Une fois mûré, l'ARNm est exporté vers le cytoplasme et la PABP II liée à la queue poly(A) est remplacée par la PABP cytosolique qui facilite la structuration de l'ARNm en « boucle fermée » en interagissant avec les facteurs d'initiation de la traduction associés à la coiffe (Mangus, Evans et al. 2003). Cela a pour effet d'une part de faciliter la traduction de l'ARNm en favorisant le recyclage des ribosomes, et d'autre part de stabiliser le transcrit en empêchant l'accessibilité de la queue poly(A) aux enzymes de déadénylation et par conséquent de protéger l'ARNm de la dégradation 3'-5'.

c) *Épissage et épissage alternatif*

(1) *Mécanisme d'épissage*

Parallèlement aux mécanismes de maturation intervenant sur les extrémités 5' et 3', le pré-ARNm subit un autre type de maturation : l'épissage. Ce mécanisme permet d'éliminer les séquences introniques du transcrit naissant, afin de mettre les séquences exoniques en place pour la traduction.

L'épissage est un processus nucléaire réalisé par deux étapes de trans-estérification (**Figure 19**). La première trans-estérification débute par une attaque nucléophile de l'extrémité 2'-OH du ribose de l'adénosine situé au point d'embranchement sur la liaison phosphodiester du résidu guanosine présent au niveau du site d'épissage en 5'. Il y a alors formation d'une interaction covalente entre ces deux nucléotides permettant à l'intron d'adopter la forme d'un lasso. L'extrémité 3'-OH libre de l'exon en amont réalise la deuxième trans-estérification par l'attaque nucléophile de la liaison phosphodiester du résidu guanosine au niveau du site d'épissage en 3'. Ainsi il y a détachement de l'intron sous forme de lasso, et liaison entre les deux exons.

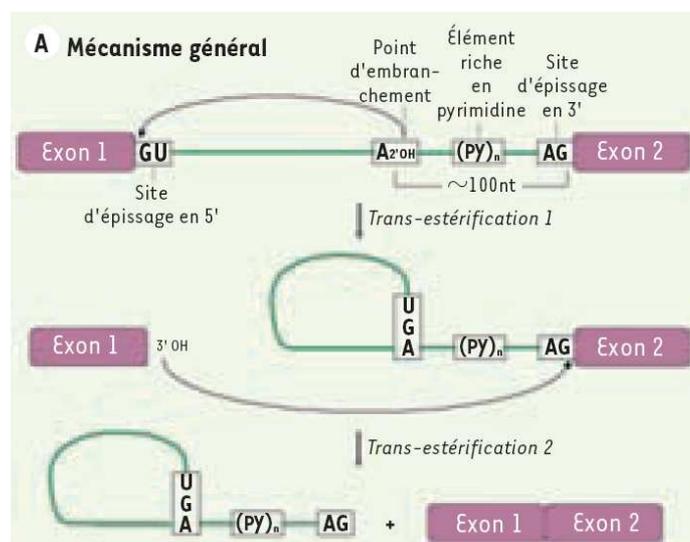


Figure 19: Mécanisme général d'épissage (Parent and Bisailon 2006).

Les deux étapes de trans-estérification sont assurées par un complexe catalytique macromoléculaire dynamique appelé spliceosome, dont l'assemblage est un processus séquentiel de fixation et de libération de cinq petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNPs) et de nombreux autres facteurs (Chen and Manley 2009) (*Figure 20*).

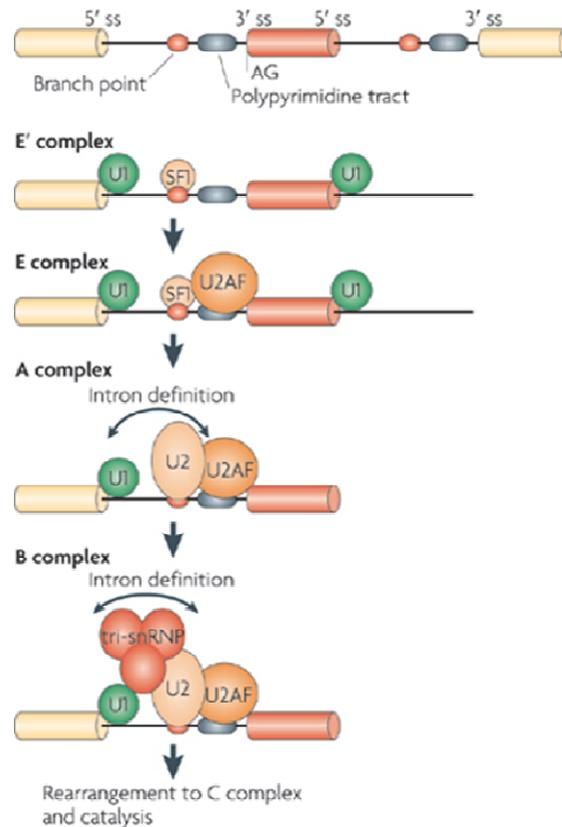


Figure 20: Formation du spliceosome (Chen and Manley 2009).

L'assemblage de ce complexe débute par l'appariement de U1snRNP sur le site d'épissage en 5' et par la fixation de SF1 (Splicing Factor 1) au niveau du point d'embranchement pour former le complexe E'. Le complexe E' sera ensuite converti en complexe E par le recrutement du facteur U2AF (U2 Auxiliary Factor) qui va couvrir la séquence riche en pyrimidine et le site d'épissage en 3'. Le facteur SF1 sera ensuite remplacé par U2snRNP au niveau du point d'embranchement. Le complexe A apparaît grâce à la réorganisation du pré-spliceosome qui implique la

formation d'interactions entre les facteurs U1, U2 et U2AF qui contribue au rapprochement des exons et favorise leur éventuelle liaison. Ensuite le recrutement du tri-snRNP U4/U5/U6 entraîne la formation du complexe B, qui contient tous les facteurs nécessaires au processus d'épissage. Le complexe va subir des remodelages et des changements conformationnels, comprenant la libération des facteurs U1 et U4 snRNP, pour finalement aboutir au complexe C, qui est le complexe catalytique nécessaire aux deux réactions de trans-estérification.

(2) *Epissage alternatif*

L'épissage alternatif est un mécanisme important responsable de la grande diversité des transcrits et des protéines chez les eucaryotes. Effectivement il permet, à partir d'un même pré-ARNm, d'obtenir plusieurs ARNm matures et donc plusieurs protéines, par l'inclusion ou l'exclusion différentielle de séquences exoniques et introniques (**Figure 21**). De récentes estimations indiquent que près de 95% des gènes multi-exoniques humains subissent un épissage alternatif (Nilsen and Graveley 2010).

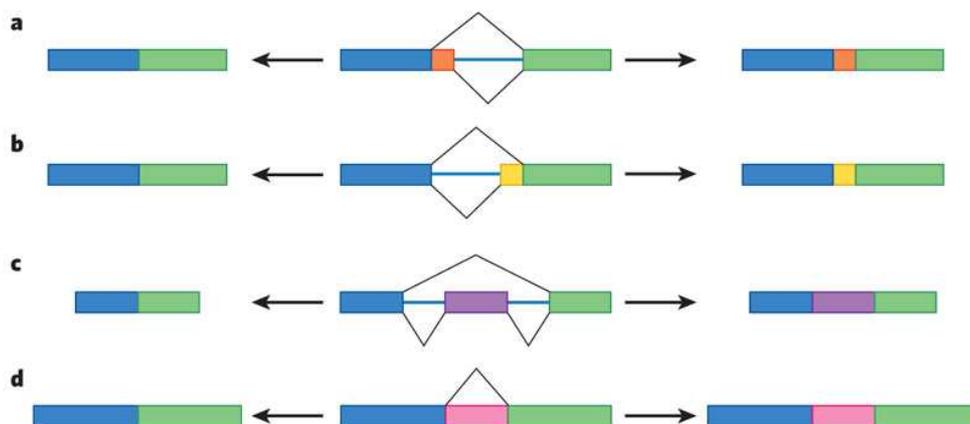


Figure 21: Représentation schématique des différents types d'épissage alternatif (Nilsen and Graveley 2010). (a) site de sélection d'épissage alternatif en 5' ; (b) site de sélection d'épissage alternatif en 3' ; (c) inclusion ou saut d'une cassette exonique ; (d) rétention d'un intron.

L'épissage alternatif est un processus complexe qui implique la machinerie du spliceosome (voir ci-dessus) et des séquences *cis*-régulatrices divisées en quatre catégories. D'une part on trouve les éléments présents sur les séquences exoniques capables soit de favoriser l'épissage, et appelées ESE (Exonic Splicing Enhancers), soit de l'inhiber, avec les ESS (Exonic Splicing Silencers). De la même manière dans les séquences introniques on trouve des éléments *cis*-régulateurs avec les séquences favorisant l'épissage, ISE (Intronic Splicing Enhancers) et les séquences inhibitrices ISS (Intronic Splicing Silencers). Ces éléments *cis*-régulateurs seront reconnus par divers facteurs protéiques se liant à l'ARN qui seront capables d'influer sur le choix des différents sites d'épissage par le spliceosome. Parmi ces protéines on retrouve les protéines de la famille SR (appelées ainsi car elles contiennent des domaines riches en sérine et arginine) connues pour activer l'épissage en se liant aux séquences ESE et ISE et en recrutant la machinerie du spliceosome. A l'inverse, les protéines de la famille des hnRNP (heterogeneous nuclear RNP) se lient préférentiellement aux séquences ESS et ISS ont tendance à inhiber l'épissage en interférant avec le recrutement du spliceosome (**Figure 22**). D'autres facteurs présentant une expression tissu-spécifique peuvent intervenir dans cette régulation, et donc permettre d'exprimer préférentiellement une isoforme d'ARNm et une isoforme de protéine en fonction du tissu (ex : FOX, NOVA, PTB, TIA1).

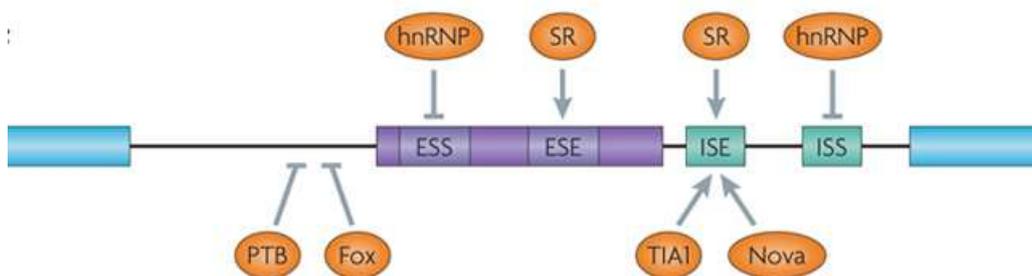


Figure 22 : Représentation schématique des éléments *cis* et *trans* régulateurs de l'épissage alternatif (Keren, Lev-Maor et al. 2010).

La décision finale, qui consiste à savoir si un exon « alternatif » sera inclus ou non par le mécanisme de l'épissage alternatif, reste encore mal connue. En effet, cette décision repose sur un ensemble de paramètres comme l'effet combinatoire de la fixation simultanée des facteurs *trans*-régulateurs (agonistes ou antagonistes), la position des éléments *cis*-régulateurs dans la séquence de l'ARNm, la structure secondaire de l'ARNm et également la vitesse de transcription de l'ARNm (Chen and Manley 2009).

d) *Edition*

Il existe un autre type de régulation post-transcriptionnelle qui participe à la diversité des ARN et des protéines chez les eucaryotes, c'est le mécanisme d'édition. L'édition est un mécanisme biologique qui permet à la cellule de modifier la séquence de l'ARNm durant la transcription.

La principale forme d'édition rencontrée chez les mammifères supérieurs est l'altération d'un nucléotide par un autre, qui est catalysée par les enzymes de la famille ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA). Cette famille enzymatique permet la conversion de l'adénosine en inosine (A→I) par déamination hydrolytique. L'inosine n'est pas une base classique, elle sera reconnue comme un G lors de la traduction, ce qui aura pour conséquence un changement au niveau de la séquence polypeptidique permettant la diversification des fonctions protéiques (Seeburg, Higuchi et al. 1998; Levanon, Eisenberg et al. 2004). Le mécanisme d'édition peut aussi conduire à l'insertion ou l'élimination d'un site d'épissage alternatif (Rueter, Dawson et al. 1999). Ce type de modification peut également se passer dans les régions non traduites des ARNm et influencer sur leur localisation cellulaire et/ou leur durée de vie (Nishikura 2010).

2. *Devenir de l'ARNm*

a) *Traduction*

La traduction de l'ARNm en protéine représente la dernière étape dans la voie d'expression génique, qui assure la formation du protéome à partir de l'information génomique. Le contrôle de la synthèse protéique est un mécanisme qui permet de moduler l'expression des gènes eucaryotes dans un large éventail de situations biologiques. Du développement embryonnaire précoce à la différenciation cellulaire en passant par le métabolisme, la traduction est utilisée pour affiner le niveau de protéines dans le temps et dans l'espace. La régulation de cette synthèse peut se faire sur les différentes étapes qui la composent : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Cependant l'étape limitante et la plus régulée est l'étape d'initiation de la traduction. Il existe deux types de contrôle de la traduction, d'une part un contrôle « global » par lequel la traduction de la plupart des ARNm est régulée, d'autre part une régulation qui peut être spécifique à la traduction d'un groupe d'ARNm. La régulation globale intervient principalement sur la modification des facteurs d'initiation de la traduction, alors que les régulations plus spécifiques impliquent des complexes protéiques régulateurs et également des miARNs qui reconnaissent essentiellement des séquences présentes dans les régions 5' et/ou 3' non traduites de l'ARNm.

L'initiation de la traduction débute sur des ARNm matures, c'est-à-dire coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Ces éléments sont indispensables pour le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction. La protéine d'échafaudage eIF4G, associée au facteur eIF4A, permet de faire la jonction entre la coiffe côté 5', via le facteur eIF4E lié directement à la coiffe, et la queue poly(A) côté 3' via la PABP. L'ensemble eIF4E, 4A et 4G constitue le complexe eIF4F. Par cet ensemble d'interactions, le transcrit prend une structure en boucle fermée où les deux extrémités de l'ARNm sont proches l'une de l'autre, favorisant ainsi le recyclage des sous-unités ribosomales pour un nouveau cycle de traduction (*Figure 23*). Ensuite le complexe ternaire, composé de l'ARNt chargé d'une méthionine et couplé au facteur eIF2, s'associe à la petite sous-unité ribosomale 40S ainsi qu'aux facteurs eIF3, eIF1,

eIF1A et eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 43S. Le complexe de pré-initiation sera recruté sur l'ARNm par l'interaction du facteur eIF3 avec le facteur eIF4G. Le complexe 43S va ensuite scanner l'ARNm dans le sens 5'→3' jusqu'à identifier le codon d'initiation AUG. Une fois le complexe de pré-initiation 43S lié de façon stable au codon AUG, l'ensemble donnera le complexe d'initiation 48S. L'association de la grande sous-unité 60S au complexe 48S donnera naissance au complexe final 80S, capable de catalyser la formation des premiers peptides et ainsi procéder à la phase d'élongation de la traduction.

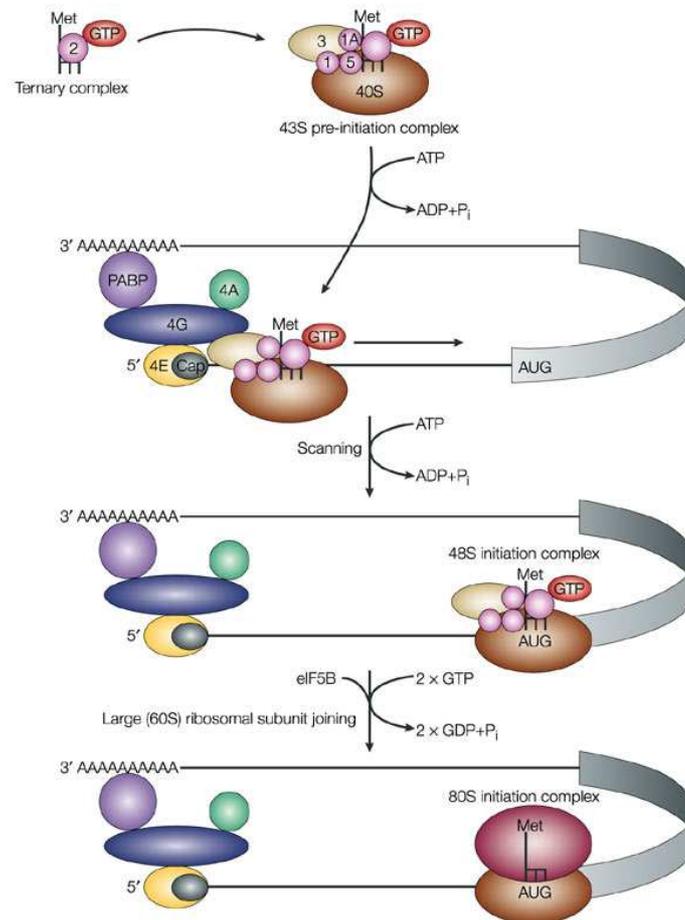


Figure 23 : Initiation de la traduction cap-dépendante (Gebauer and Hentze 2004).

b) Dégradation

Il existe trois mécanismes de dégradation des ARNm : les dégradations dépendantes de la déadénylation et indépendantes de la déadénylation, faisant intervenir des exonucléases, et la dégradation par clivage endonucléolytique. Comme il a été dit précédemment, les ARNm eucaryotes possèdent deux structures stabilisatrices, la coiffe en 5' et la queue poly(A) en 3', qui sont incorporées co-transcriptionnellement. Ces deux structures interagissent respectivement avec les protéines eIF4E et PABP, afin de protéger le transcrit des exonucléases et également afin de faciliter l'initiation de la traduction. Pour permettre la dégradation des transcrits, une de ces deux structures doit être éliminée, sauf dans le cas de la dégradation initiée par un clivage endonucléolytique.

(1) Dégradation dépendante de la déadénylation

La plupart des transcrits sont dégradés par ce mécanisme. La première étape consiste dans le raccourcissement de la queue poly(A), étape qui peut être réversible. Elle est catalysée par trois complexes de déadénylase possédant chacun des caractéristiques différentes (**Figure 24**) : PAN2-PAN3, CCR4-NOT et PARN.

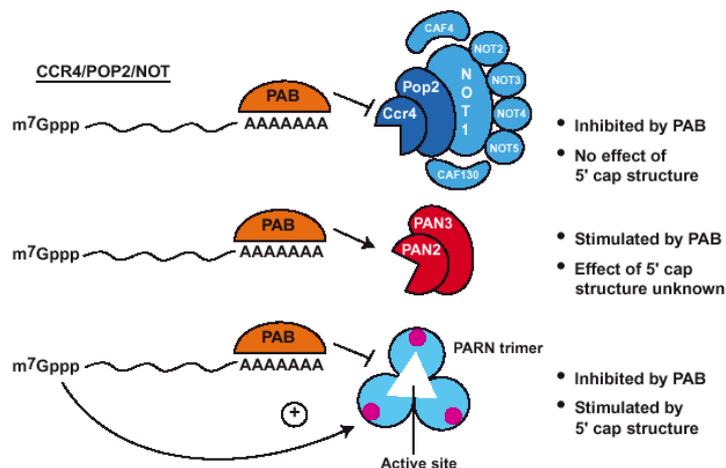


Figure 24 : Les déadénylases eucaryotiques (Parker and Song 2004).

Le complexe protéique PAN2-PAN3 (PABP-dépendant poly(A) nucléase 2 et 3) est impliqué dans la première phase de raccourcissement de la queue poly(A). Ensuite l'enlèvement complet des derniers résidus d'adénosine est catalysé soit par le complexe CCR4-NOT, dont l'activité est inhibée par la PABP, soit par l'enzyme PARN (poly(A)-specific ribonuclease), dont l'activité est favorisée par la coiffe et inhibée par la PABP. A ce stade, la dégradation de l'ARNm est irréversible. Il existe alors deux possibilités de dégradation (**Figure 25**).

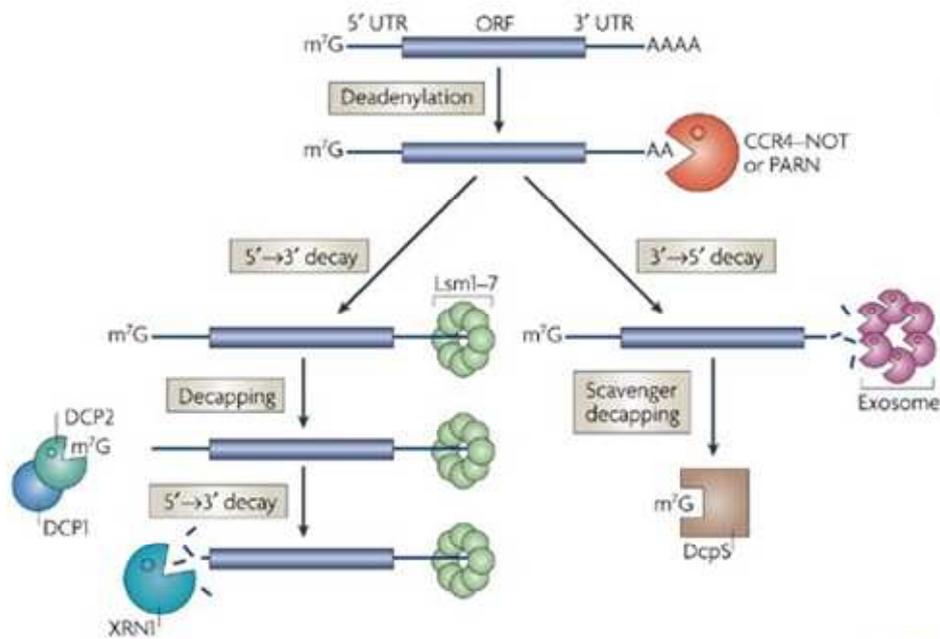


Figure 25 : Dégradation des ARNm dépendante de la déadénylation (Garneau, Wilusz et al. 2007).

L'ARNm peut être dégradé dans le sens $3' \rightarrow 5'$ par un complexe de 6 protéines appelé exosome. Une fois le corps de l'ARNm dégradé, la coiffe sera métabolisée par l'enzyme DcpS (scavenger decapping enzyme). Le transcrite peut également être dégradé dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Dans ce cas, le complexe heptamérique appelé LSM1-7 va s'associer à l'extrémité 3' déadénylée de l'ARNm, et induire l'enlèvement de la coiffe par le complexe enzymatique DCP1-DCP2 (Dipeptidyl Carboxypeptidase 1 et 2). L'ARNm sera ensuite dégradé par l'exoribonucléase XRN1 dans le sens $5' \rightarrow 3'$.

(2) Dégradation indépendante de la déadénylation

Dans ce type de dégradation moins répandu, la protéine RPS28B se fixe sur une structure tige-boucle présente dans la partie 3' non traduite de l'ARNm et recrute le facteur Edc3. Ce facteur va induire la dégradation de la coiffe par le complexe DCP1-DCP2. Le transcrit sera finalement dégradé rapidement par l'exoribonucléase XRN1 (Figure 26).

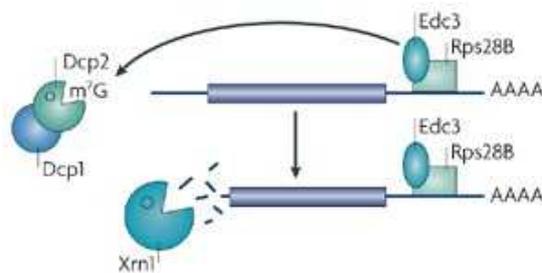


Figure 26 : Dégradation des ARNm indépendante de la déadénylation (Garneau, Wilusz et al. 2007).

(3) Dégradation par clivage endonucléolytique

Cette dégradation est initiée par un clivage interne de l'ARNm par des endonucléases. Ainsi l'ARNm se retrouve en deux fragments dont les extrémités ne sont plus protégées et donc vulnérables aux exoribonucléases. Ces fragments seront ensuite dégradés dans le sens 5'→3' par XRN1, et dans le sens 3'→5' par l'exosome (Figure 27).

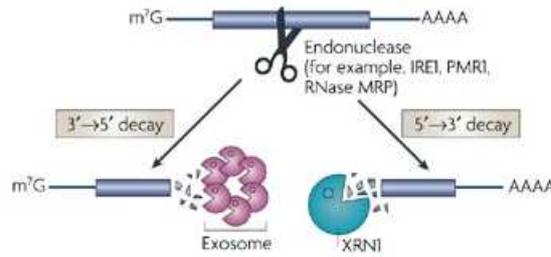


Figure 27 : Dégradation des ARNm par clivage endonucléolytique (Garneau, Wilusz et al. 2007).

c) Localisation subcellulaire

Un aspect clé dans le contrôle de l'expression génique, est l'état fonctionnel des ARNm dans le cytoplasme. Les ARNm cytoplasmiques sont contrôlés par la régulation de leur traduction, leur stabilité et leur localisation subcellulaire, processus qui sont souvent interconnectés. L'état fonctionnel des ARNm est partagé entre un état traductionnel actif et un état inactif (conduisant au stockage et/ou à la dégradation), avec pour chaque état une localisation subcellulaire spécifique (Figure 28).

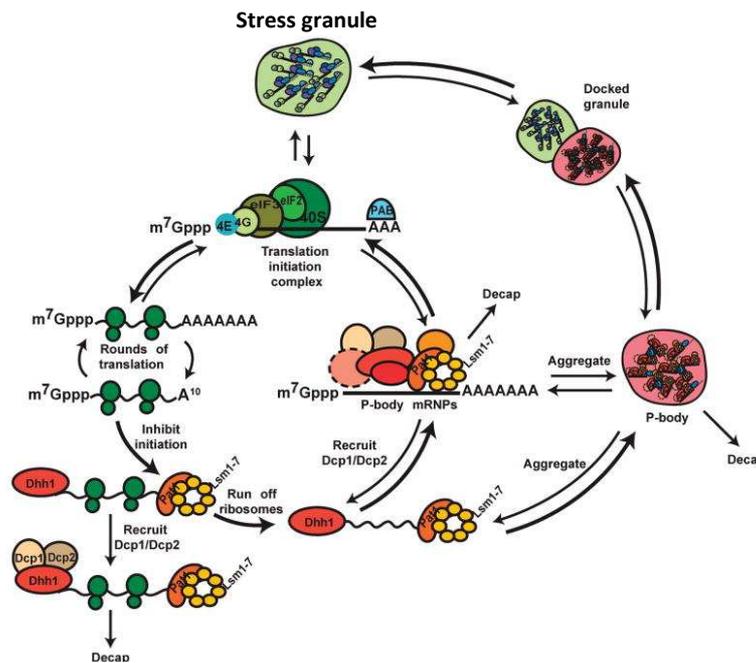


Figure 28 : Représentation schématique du cycle des ARNm (Balagopal and Parker 2009).

Le plus souvent les ARNm, une fois exportés dans le cytoplasme, sont engagés dans le processus de traduction. Une molécule d'ARNm est traduite simultanément par de multiples ribosomes portant des chaînes polypeptidiques naissantes de longueur croissante. Ces structures appelées polyribosomes ou polysomes correspondent à une zone où les ARNm sont hautement traduits. Dans le cas des ARNm non traduits, ceux-ci pourront être dirigés vers deux structures : les P-bodies (processing bodies) et les granules de stress.

Les P-bodies contiennent la machinerie de dégradation des ARNm comme les enzymes de décoiffage DCP1 et DCP2, des activateurs du décoiffage, Edc3 et le complexe Lsm1-7, et l'exonucléase XRN1. Ces structures contiennent également les protéines impliquées dans le NMD (Nonsense Mediated Decay) (voir paragraphe II.A.3.a)(1)) et la machinerie de répression des miARNs. Les P-bodies sont considérés comme des structures dynamiques spécialisées dans le stockage et la dégradation des ARNm (Balagopal and Parker 2009).

Les ARNm non traduits peuvent également former une seconde structure appelée granule de stress. Ces structures dynamiques sont composées des ARNm complexés aux facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3 et eIF2), à la sous-unité ribosomale 40S et à la PABP. Ces granules contiennent également des répresseurs traductionnels tels que les facteurs TIA1 et TIAR. La formation de ces structures est souvent la résultante d'un stress (stress oxydant, élévation de la température ou exposition aux UV, etc.) qui entraîne une inhibition de la traduction. Dans la plupart des cas, cette inhibition se met en place après la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2- α , un facteur nécessaire à l'incorporation de l'ARN de transfert chargé en méthionine nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation 48S lors de l'initiation de la traduction. La protéine TIA1 qui est un répresseur traductionnel, serait également impliquée dans la formation des granules de stress et agirait en aval de la phosphorylation d'eIF2- α . Selon une hypothèse, la protéine TIA1 et le complexe ternaire seraient en compétition pour fixer le même site sur le complexe de pré-initiation 48S. Ainsi, suivant que l'ARNm est fixé par l'un ou l'autre de ces facteurs, il sera alors retrouvé soit dans la fraction polysomale pour être traduit, soit dans les granules de stress (Kedersha and Anderson 2002). D'autres protéines impliquées dans la stabilité des ARNm sont retrouvées dans les

granules de stress, comme par exemple la protéine HuR (qui favorise la stabilité) et la protéine TTP (qui déstabilise les ARNm). Ceci suggère que les granules de stress seraient des microdomaines dynamiques servant de site de triage pour les transcrits durant un stress.

En conclusion, ces micro-compartiments concentrent une partie des facteurs nécessaires à la répression transitoire des gènes, qu'elle se fasse par la dégradation des ARNm ou l'inhibition traductionnelle. Ils pourraient servir de centre d'aiguillage contrôlant le trafic, la disponibilité et la quantité des ARNm et donc représentent un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de première importance.

3. Mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle

a) Contrôle qualité des ARNm

Après transcription, modification et épissage, l'ARNm est exporté dans le cytoplasme pour y être traduit en protéine. Cependant, ces différentes étapes de maturation de l'ARNm peuvent être source d'erreurs plus ou moins dommageables pour la cellule (expression de protéine tronquée). Pour détecter la production d'ARNm possédant des anomalies, la cellule a mis en place un système de contrôle qualité.

(1) Nonsense-mediated decay (NMD)

Le mécanisme NMD (*Figure 29*) permet de détecter et dégrader les transcrits qui contiennent un codon stop prématuré : PTC (Premature Termination Codon). L'apparition de ce codon stop prématuré peut être due à des mutations, à un décalage du cadre de lecture ou à un défaut dans le traitement des ARNm (Conti and Izaurralde 2005). Il a également été montré que le mécanisme NMD est aussi impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux transcrits « normaux » (Hillman, Green et al. 2004; Mendell, Sharifi et al. 2004). Au cours de l'épissage, les complexes multiprotéiques EJC (Exon Junction Complexe) sont associés à la

jonction de deux exons épissés. Dans un contexte normal, ces complexes sont décrochés au cours de la traduction lors du passage du premier ribosome. Cependant dans les ARNm contenant un PTC, le complexe EJC reste associé au transcrit en aval du PTC, où il sera détecté par la machinerie de surveillance. Cet état "anormal", détecté par le système de surveillance des ARNm, va permettre la fixation d'UPF2 (up-frameshift 2) sur UPF3 (déjà fixé sur l'EJC dans le noyau). En parallèle le complexe SURF (comprenant SMG1, UPF1, eRF1 et eRF3) va se fixer sur le ribosome arrêté, et par l'interaction des facteurs UPF1 et UPF2 il va y avoir liaison de l'EJC au codon de terminaison prématuré. La phosphorylation de UPF1 par SMG1 entraîne la dissociation des facteurs eRF1 et eRF3, et la fixation de la protéine adaptatrice SMG7. L'ARNm sera ensuite dégradé soit dans le sens 5'→3' (après décoiffage), soit dans le sens 3'→5' (après déadénylation) ou par clivage endonucléolytique par le facteur SMG6 également recruté lors de la phosphorylation de UPF1 (Lejeune, Li et al. 2003; Eberle, Lykke-Andersen et al. 2009).

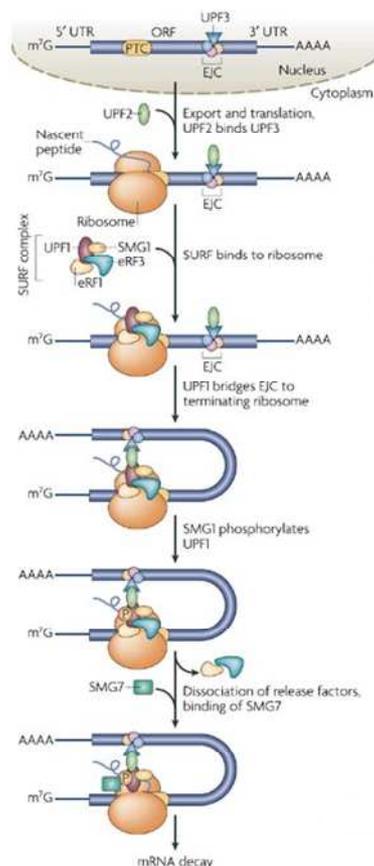


Figure 29 : Mécanisme de surveillance des ARNm : Nonsense-mediated decay (Garneau, Wilusz et al. 2007).

(2) *Non-stop decay (NSD)*

Ce mécanisme permet l'élimination des transcrits dépourvus de codon stop (Frischmeyer, van Hoof et al. 2002; van Hoof, Frischmeyer et al. 2002). Ce type d'ARNm peut être la conséquence d'un clivage de l'ARNm ou bien d'une polyadénylation prématurée. Dans ce cas, les ribosomes ne s'arrêtent pas et traversent la queue poly(A) décrochant ainsi les PABPs. Deux voies sont alors possibles (**Figure 30**). La première consiste à recruter le facteur Ski7, une protéine adaptatrice capable de mimer un ARNt. La fixation de Ski7 au niveau du ribosome va entraîner son décrochage de la queue poly(A), et permettre le recrutement de l'exosome qui dégradera le transcrit. Dans la deuxième voie, en absence de Ski7, l'enlèvement des PABPs par le ribosome rend le transcrit vulnérable au décoiffage. Une fois la coiffe enlevée, l'ARNm sera dégradé par l'exonucléase Xrn1.

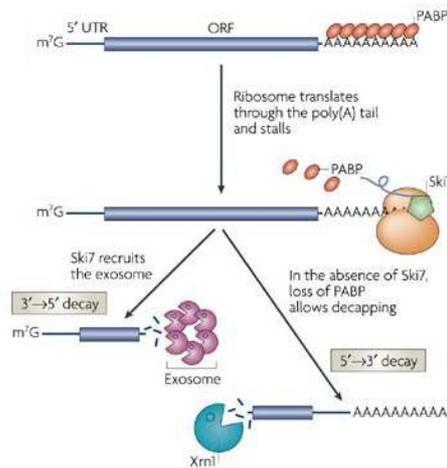


Figure 30 : Mécanisme de surveillance des ARNm : Non-stop decay (Garneau, Wilusz et al. 2007).

(3) *No-go decay (NGD)*

Le dernier mécanisme connu de surveillance des ARNm (**Figure 31**) permet de dégrader les transcrits ayant subi un problème lors de la phase d'élongation de leur

traduction entraînant l'arrêt des ribosomes. Ce type de problème peut être dû à la présence d'une structure secondaire mais également à un défaut des ribosomes qui ont pu initier la traduction mais se retrouvent incapables de catalyser la phase d'élongation de la traduction (Doma and Parker 2006). Une fois le ribosome bloqué sur le cadre de lecture du transcrit, les facteurs Dom34 et Hbs1 sont recrutés au niveau du ribosome et induisent le clivage endonucléolytique de l'ARNm. Les deux fragments générés sont vulnérables aux attaques des exonucléases, et seront donc dégradés par l'exosome et XRN1.

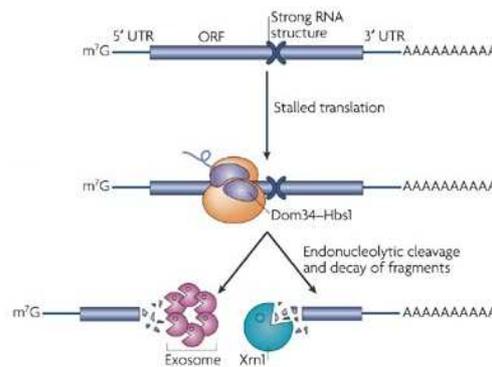


Figure 31 : Mécanisme de surveillance des ARNm : No-go decay (Garneau, Wilusz et al. 2007).

b) Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes

L'expression génique peut être finement régulée au niveau post-transcriptionnel. Cette régulation nécessite de nombreux facteurs régulateurs car elle doit se faire avec précision à un temps donné et un endroit donné. Les mécanismes post-transcriptionnels font intervenir des éléments *cis* localisés dans l'ARNm et des facteurs *trans*-régulateurs qui s'y associent. La nature de l'association élément *cis*/facteur *trans* contrôle positivement et/ou négativement le recrutement des machineries de dégradation des ARNm et d'inhibition de la traduction.

Le système de dégradation des ARNm intervient dans le processus général et naturel de vieillissement de l'ARNm. Il peut intervenir également dans un contexte plus particulier lorsqu'il doit par exemple induire la dégradation rapide d'un ARNm ou un pool d'ARNm afin de contrôler l'expression d'un ou plusieurs gènes au niveau post-transcriptionnel. Ce système fonctionne sur la base d'éléments *cis*-régulateurs disséminés dans la séquence de l'ARNm. Ces éléments définissent non seulement la stabilité (ou demi-vie) d'un ARNm, mais ils peuvent également contrôler son efficacité de traduction. Ils sont retrouvés dans toutes les régions de l'ARNm : régions 5' et 3' NT et région codante (**Figure 32**). Il semble cependant que les éléments *cis* localisés dans la région 5'NT ou dans la région codante fassent appel à des facteurs plutôt spécifiques, alors que ceux retrouvés dans la région 3'NT font appel à des mécanismes plus globaux, quoiqu'extrêmement complexes.

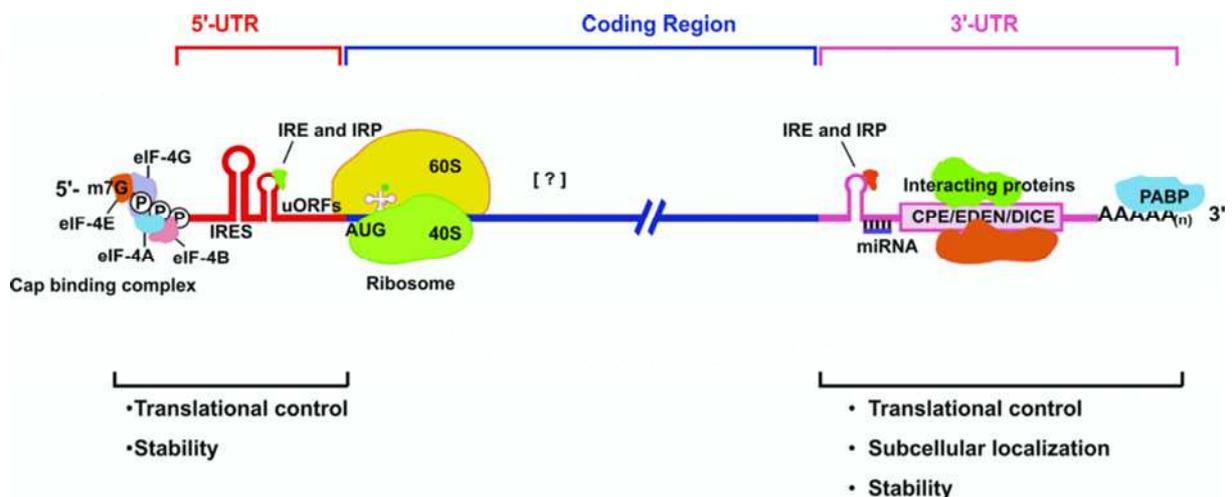


Figure 32 : Structure générale d'un ARNm eucaryote illustrant les éléments de régulation post-transcriptionnelle (Chatterjee and Pal 2009).

Le rôle des différentes structures mentionnées sur ce schéma va être expliqué dans les paragraphes suivants.

c) *Régulation par le 5'NT*

(1) *Les IRES : Internal Ribosome Entry Site*

La traduction des ARNm eucaryotiques est généralement dépendante de la coiffe (m7GpppN), une structure présente à l'extrémité 5' des ARNm (Voir paragraphe II.A.1.a)). L'initiation de la traduction via la coiffe nécessite la fixation du facteur eIF4F puis le recrutement de la sous-unité 40S ribosomale qui va scanner le 5'NT de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation AUG. La traduction dépendante de la coiffe permet à la cellule de réguler de façon plutôt globale l'expression des gènes en modulant l'assemblage et/ou l'activité des composants nécessaires à l'initiation de la traduction. Cette modulation se fait généralement par la phosphorylation ou la déphosphorylation des facteurs d'initiation de la traduction comme cela a été observé lors de certains stress cellulaires (voir paragraphe II.A.2.c)).

Dans certains cas, comme par exemple un stress cellulaire, où la traduction dépendante de la coiffe est inhibée, la cellule est capable de mettre en place un mécanisme alternatif d'initiation de la traduction afin de maintenir la synthèse de certaines protéines nécessaires à la "réparation" cellulaire post-stress (Graber and Holcik 2007; Thomas and Johannes 2007). Ce mécanisme est indépendant de la coiffe et fait intervenir une structure secondaire localisée dans le 5'NT de l'ARNm. Cette structure permet le recrutement interne de la petite sous-unité du ribosome d'où son nom, IRES pour "Internal ribosome-entry site" (Lopez-Lastra, Rivas et al. 2005) (**Figure 33**). La séquence nucléotidique ainsi que la taille de ces structures sont très variables d'un IRES à un autre. Le mode de recrutement de la sous-unité ribosomale est mal connu à ce jour, car il diffère d'un IRES à un autre. Certains IRES ne nécessitent pas l'intervention des facteurs d'initiation de la traduction et recrutent directement les ribosomes via leurs structures secondaires et tertiaires. A l'inverse, d'autres IRES nécessitent quelques eIFs ainsi que des facteurs *trans*-activateurs se liant à l'ARNm, appelés ITAFs (IRES trans-acting factors), pour permettre le recrutement des ribosomes (Fitzgerald and Semler 2009). Il est intéressant de noter que parmi ces ITAFs on retrouve de nombreux hnRNPs (hnRNP I, hnRNP E, hnRNP

C1/C2 et hnRNP D), également impliqués dans la maturation des pré-ARNm, l'export cytoplasmique des transcrits et leur localisation, leur stabilité et leur traduction.

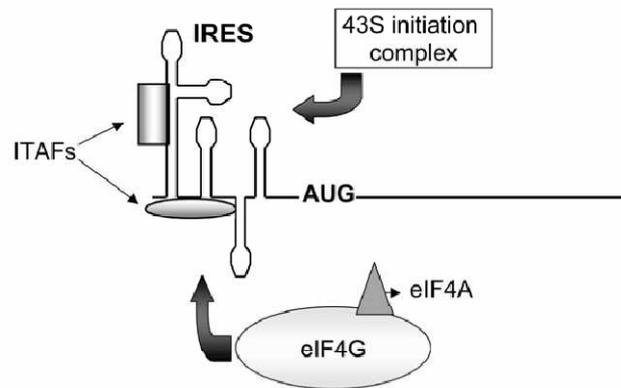


Figure 33 : Représentation schématique d'un IRES (Lopez-Lastra, Rivas et al. 2005).

(2) Les IRE : Iron Response Element

L'homéostasie cellulaire des ions ferriques Fe^{2+} fait appel à une corégulation du récepteur à la transferrine (TfR : transferrin receptor) et de la Ferritine qui permettent respectivement le captage du fer sérique et le stockage des ions Fe^{2+} .

C'est une régulation post-transcriptionnelle qui implique deux protéines IRP1 et IRP2 (Iron Regulatory Protein) et une séquence IRE (Iron Response Element). Cette séquence est retrouvée dans le 5'NT de l'ARNm codant pour la Ferritine (une copie) et dans le 3'NT de l'ARNm codant pour le TfR (plusieurs copies). Dans des conditions de carence intracellulaire en fer, les IRPs se fixent sur les séquences IRE du 3'NT de l'ARNm codant pour le TfR et stabilisent cet ARNm en le protégeant de l'activité d'endonucléases. Le but est d'augmenter l'activité de captage du fer sérique au niveau de la membrane et l'entrée d'ion Fe^{2+} dans la cellule. Parallèlement, les IRPs se fixent sur la séquence IRE localisée dans le 5'NT de l'ARNm de la Ferritine et inhibent la traduction de cet ARNm (Pantopoulos 2004) (**Figure 34**). Ici, le but est de

diminuer le stockage du fer intracellulaire pour qu'il soit mis à la disposition de la cellule.

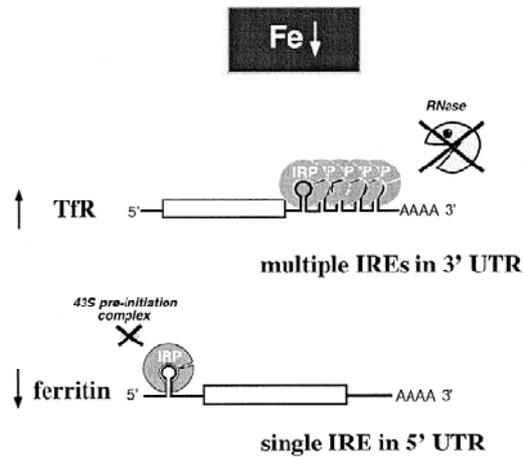


Figure 34 : Mécanisme de régulation de TfR et de la ferritine en carence de fer (Pantopoulos 2004).

Dans le cas inverse, en excès d'ions Fe^{2+} intracellulaires, les IRPs ne peuvent plus se fixer sur la séquence IRE. L'ARNm de TfR n'étant plus protégé, il est rapidement dégradé. Parallèlement, l'inhibition de la traduction de l'ARNm Ferritine est levée (Pantopoulos 2004) (**Figure 35**). Au final, l'entrée d'ions Fe^{2+} est diminuée alors que leur stockage est favorisé.

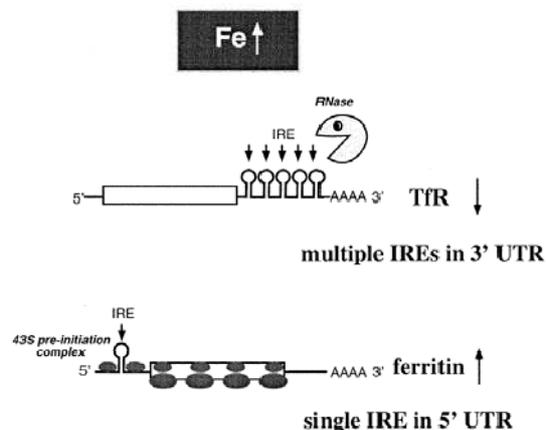


Figure 35 : Mécanisme de régulation de TfR et de la ferritine en excès de fer (Pantopoulos 2004).

(3) Les uORF: upstream Open Reading Frame

Les uORFs sont des cadres ouverts de lecture (Open Reading Frame : ORF) de petite taille en amont de l'ORF fonctionnel dans la partie 5'NT de l'ARNm. Ces uORF sont capables d'inhiber la traduction en restreignant l'accès des ribosomes au « vrai » codon d'initiation. Ce type de régulation dépend du nombre de uORF et du nombre de complexes ternaires d'initiation de la traduction disponibles (Jackson, Hellen et al. 2010). Parmi les exemples connus, le mieux caractérisé chez les mammifères est la régulation de la traduction d'ATF4 par deux uORF (**Figure 36**) (Vattem and Wek 2004). ATF4 (Activating Transcription Factor 4) est un facteur de transcription dont l'expression est induite en condition de stress. En condition normale, les ribosomes initient la traduction sur l'uORF1 et la sous-unité ribosomale 60S se dissocie de la 40S à la fin de sa traduction. La sous-unité 40S scanne l'ARNm jusqu'à l'uORF2 et, étant en excès de complexes ternaires, a le temps de recharger un nouveau complexe pour initier la traduction du uORF2. Comme l'uORF2 chevauche l'ORF d'ATF4, la traduction d'uORF2 supprime la traduction d'ATF4. Au cours d'un stress du réticulum endoplasmique, la disponibilité en complexe ternaire est réduite par phosphorylation du facteur eIF2 α , les ribosomes scannent l'uORF2 et initient la traduction au niveau du codon d'initiation d'ATF4.

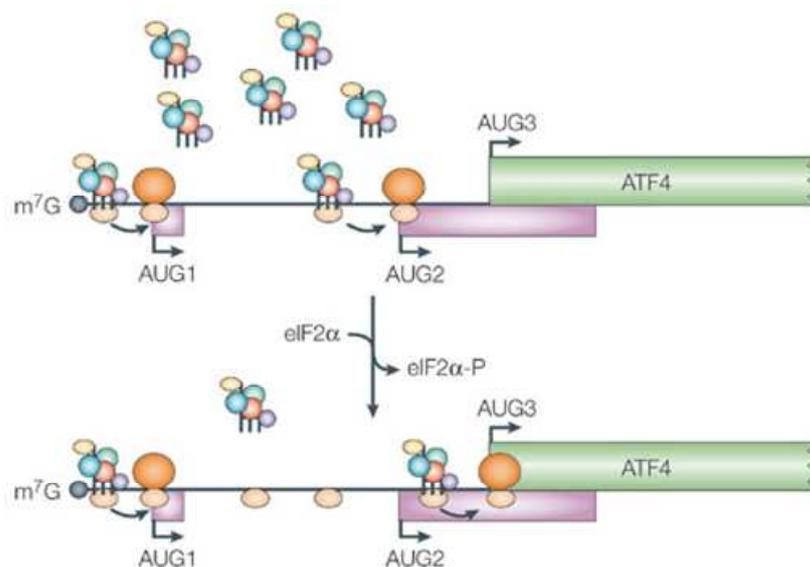


Figure 36 : Exemple de régulation par les uORF (Holcik and Sonenberg 2005).

d) Régulation par la phase codante

La description de séquences *cis*-régulatrices dans la phase codante d'un ARNm est plutôt rare. Ce qui tendrait à dire que ces ARNm font partie de cas particuliers. Ces séquences, appelées CRD (Coding Region Determinant of instability), sont retrouvées dans certains ARNm comme ceux codant pour c-fos, c-myc et la β -tubuline (Guhaniyogi and Brewer 2001). Ces séquences sont reconnues par des protéines de la famille des CRD-BP (CRD-Binding Proteins). Cette fixation peut protéger l'ARNm de la dégradation par des endonucléases et de ce fait augmenter la demi-vie de celui-ci (Doyle, Leeds et al. 1998; Sparanese and Lee 2007). Elles peuvent participer à la dégradation de l'ARNm et ce, indépendamment de la présence d'autres éléments *cis*-régulateurs comme par exemple un ARE dans le cas de c-fos et c-myc (Doyle, Leeds et al. 1998; Grosset, Chen et al. 2000). La régulation par le CRD de c-fos fait intervenir un mécanisme dépendant de la déadénylation via le recrutement de la déadénylase PARN (Grosset, Chen et al. 2000; Chang, Yamashita et al. 2004). Ces éléments interviennent également dans l'export nucléaire et la localisation cytoplasmique préférentielle de l'ARNm, comme dans le cas de l'ARNm de c-myc (Doyle, Leeds et al. 1998).

e) Régulation par le 3'NT

Les régulations post-transcriptionnelles des ARNm font majoritairement intervenir des éléments *cis* localisés dans la région 3' NT dont le rôle est de moduler la stabilité et/ou l'efficacité de traduction de l'ARNm porteur comme par exemple les séquences CPE (Cytoplasm polyadenylation element), EDEN (Embryonic deadenylation signal) ou DICE (Differential control element). Les éléments *cis* les plus étudiés sont les éléments riches en adénosine et uridine (AREs). Mais la communauté internationale s'intéresse depuis peu à une autre classe d'éléments régulateurs post-transcriptionnels que sont les miARNs dont les sites sont localisés principalement mais pas seulement dans le 3'NT. De nombreux ARNm codant pour des oncogènes, des cytokines, des interleukines et des facteurs du cycle cellulaire tels que c-Fos, c-Myc, TNF- α et les cyclines A, B1 et D1 contiennent au moins un élément *cis*-

régulateur post-transcriptionnel dans leur 3'NT. Il est intéressant de noter que les gènes décrits ici sont retrouvés surexprimés dans certains cancers et certaines maladies inflammatoires. Dans ce manuscrit, je décrirai plus particulièrement les régulations post-transcriptionnelles contrôlées par les miARNs et par les AREs.

B. Régulation par les miARNs

Ces dernières années une classe distincte de régulateurs post-transcriptionnels suscite une attention croissante : les petits ARNs non codants. Ici je m'intéresserai plus particulièrement à une sous-classe de cette famille : les microARNs (miARNs). Les miARNs ont une taille d'environ 21 nucléotides. Chez les mammifères, les miARNs seraient capables de contrôler l'expression d'environ 60% des gènes codant pour des protéines (Friedman, Farh et al. 2009).

1. Biogenèse des miARNs

Dans la plupart des cas les miARNs sont issus d'un précurseur (le pri-miARN) transcrit par la polymérase II (Pol II) à partir d'un gène spécifique. Le pri-miARN est un long transcrit structuré « en épingle à cheveux », coiffé en 5', polyadénylé et épissé. Un seul pri-miARN peut produire plusieurs miARNs fonctionnels (Kim, Han et al. 2009). Les miARNs peuvent également être issus d'une séquence intronique (mirtron) appartenant à un ARNm ne codant pas pour un miARN, dans ce cas le pre-miARN est produit par épissage grâce au spliceosome. Dans la voie canonique, le pri-miARN sera transformé en miARN mature au cours de deux étapes séquentielles, l'une nucléaire et l'autre cytoplasmique, catalysées par deux enzymes de la famille des RNase III : Drosha et Dicer (*Figure 37*).

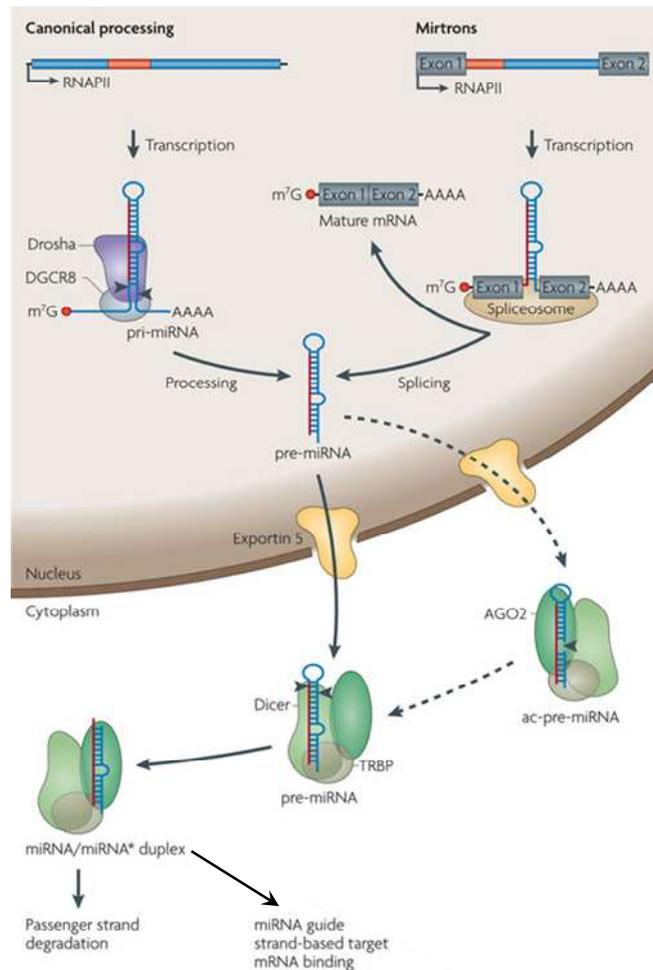


Figure 37 : Biogenèse des micro-ARN (Krol, Loedige et al. 2010).

Dans la première étape nucléaire, le pri-miARN est clivé par le complexe Drosha/DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) pour donner un pré-miARN d'une longueur d'environ 70 nucléotides avec une extrémité 3' de 2 nucléotides libres. Grâce à cette extrémité 3' libre, le précurseur pré-miARN est pris en charge par le facteur d'export nucléaire exportin 5 (EXP5). Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par la RNase III Dicer, elle-même complexée avec la protéine TRBP, pour donner un duplex miARN/miARN* d'environ 20 paires de bases. Dans le cytoplasme le pré-miARN peut aussi être clivé par la protéine AGO2 (Argonaute 2) qui possède une activité ribonucléase, et ainsi contourner la voie de maturation par Dicer (Diederichs and Haber 2007). Ce processus intermédiaire est appelé ac-pre-miRNA (AGO2-cleaved precursor miRNA).

Après ces étapes, le brin « passager » (miARN*) sera dégradé et le brin « guide » sera incorporé dans le complexe miRISC (miRNA-induced silencing complex). L'assemblage de ce complexe est un processus dynamique, impliquant les protéines Dicer, TRBP, Argonaute 1 à 4 (AGO 1-4), mais les détails ne sont, à ce jour, pas bien connus.

2. *Mode d'action des miARNs*

Les miARNs s'apparient majoritairement au niveau du 3' NT de l'ARNm cible et agissent de façon négative sur l'expression génique via une régulation post-transcriptionnelle (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008). Malgré une complémentarité partielle avec leurs cibles, l'appariement des miARNs respecte un certain nombre de caractéristiques communes et nécessaires à leur fonction (**Figure 38**).

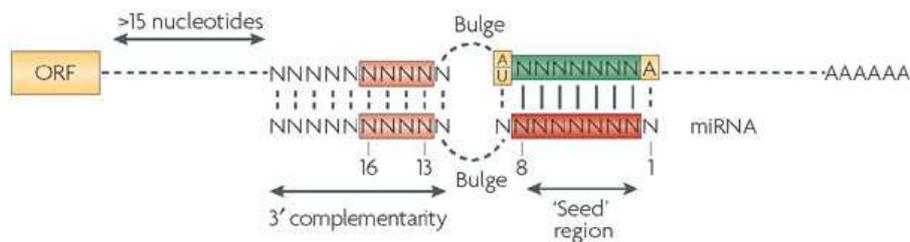


Figure 38 : Modèle d'appariement d'un mi-ARN avec sa cible ARNm (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008).

La première caractéristique est la présence en 5' d'un appariement parfait entre le miARN et l'ARNm cible sur les nucléotides de la position 2 à la position 8, appelé "seed" (ou graine). Il existe une certaine variabilité au niveau des positions 1 et 9. Un résidu A en position 1 et un résidu A ou U en position 9 améliore l'efficacité, même s'il n'est pas nécessaire que ces bases s'apparient pour la fonctionnalité du miARN (Grimson, Farh et al. 2007). La présence de paires GU ou de boucles de mésappariements dans la région de seeding affecte la répression des miARN. Une

autre caractéristique dans la fixation du miARN sur sa cible est la présence d'une boucle de non-appariement immédiatement après la région de seeding, qui va conditionner le potentiel régulateur du complexe miRISC. La troisième caractéristique est la complémentarité partielle de l'extrémité 3' du miARN avec sa cible où les mésappariements sont généralement tolérés. Au niveau des bases 13 à 16, une parfaite complémentarité augmente l'efficacité du miARN (Grimson, Farh et al. 2007). D'autres facteurs peuvent aussi influencer l'efficacité des miARNs comme des régions riches en AU près de la zone de « seeding », ou la distance d'appariement du miARN par rapport au codon stop et la queue poly(A) (Grimson, Farh et al. 2007). Néanmoins, si ces caractéristiques d'appariement sont souvent retrouvées chez les mammifères, il existe des exceptions.

Le degré de complémentarité dans le duplex miARN-ARNm est considéré comme un déterminant clé dans le mécanisme de régulation des miARNs. Une complémentarité parfaite permettrait le clivage du brin ARNm catalysé par la protéine AGO2, alors que la présence d'une boucle centrale de mésappariement favoriserait la répression de la traduction.

a) Répression de la traduction

Le mécanisme par lequel le complexe miRISC régule la traduction est encore sujet à débat. La question est de savoir si la répression de la traduction se produit au niveau de l'étape d'initiation de la traduction ou au niveau de l'étape d'élongation (***Figure 39***).

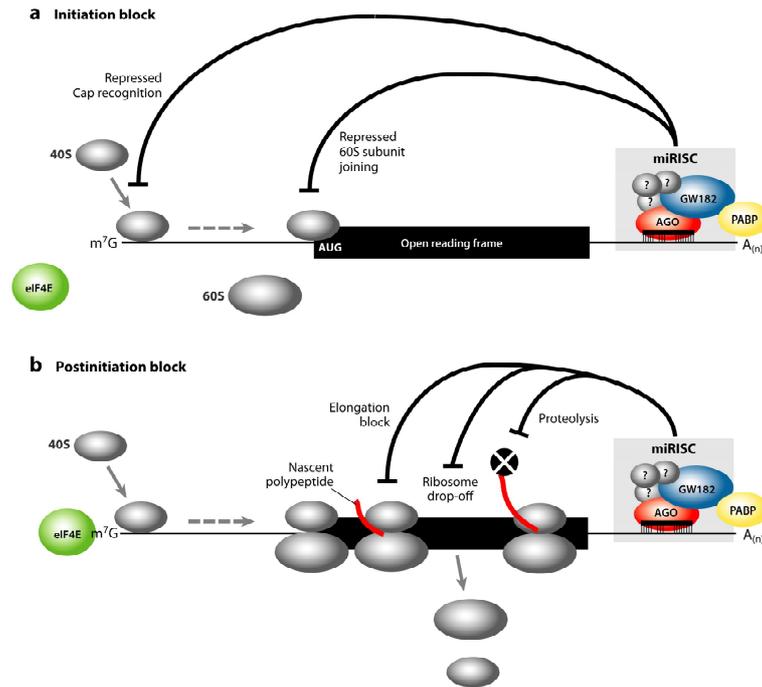


Figure 39 : Répression de la traduction par les miARNs (Fabian, Sonenberg et al. 2010).

Le complexe miRISC pourrait inhiber l'initiation de la traduction soit en interférant avec le processus de reconnaissance de la coiffe par le complexe eIF4F et le recrutement de la petite sous-unité ribosomale 40S (Humphreys, Westman et al. 2005; Mathonnet, Fabian et al. 2007) soit en empêchant le recrutement de la sous-unité 60S (Chendrimada, Finn et al. 2007) (**Figure 39a**). L'interaction du complexe miRISC avec la PABP, par l'intermédiaire de la protéine GW182, pourrait interférer avec la structuration de l'ARNm en boucle fermée, contribuant ainsi à la répression de l'initiation de la traduction. La répression de la traduction peut également s'effectuer sur les étapes post-initiation où le complexe miRISC pourrait inhiber l'élongation des ribosomes, induisant le décrochage des ribosomes, ou en facilitant la protéolyse du peptide naissant (**Figure 39b**).

b) Dégradation des ARNm

Le complexe miRISC en interagissant avec la PABP et le complexe de déadénylation CCR4-NOT1 favoriserait l'enlèvement de la queue poly(A). Ensuite l'extrémité 5' de l'ARNm sera décoiffée par les enzymes DCP1/DCP2 entraînant au final la dégradation de l'ARNm (**Figure 40**).

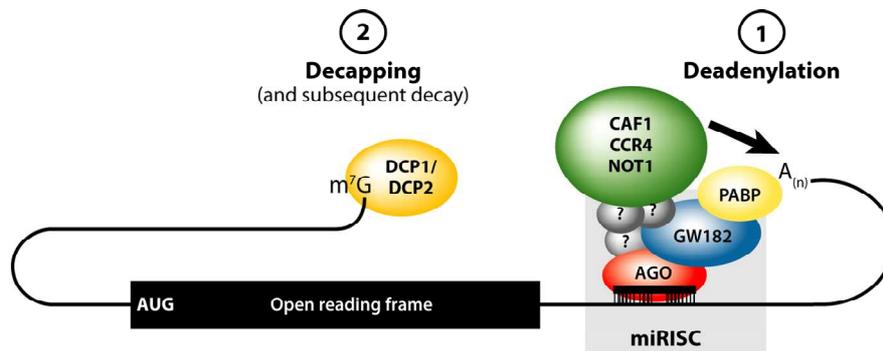


Figure 40 : Induction de la dégradation des ARNm par les miARN (Fabian, Sonenberg et al. 2010).

Dans le cas d'un appariement parfait entre le miARN et sa cible, la protéine AGO2 est recrutée et induit le clivage de l'ARNm par son activité endonucléolytique et ainsi aboutit à la dégradation totale du corps de l'ARNm (**Figure 41**).



Figure 41 : Clivage endonucléolytique de l'ARNm par la protéine AGO2 (Krol, Loedige et al. 2010).

c) Interaction des miARN avec les RBPs

Il est relativement difficile d'associer, *in silico*, un miARN à une cible ARNm, vu le faible taux d'appariement qu'ils partagent. Ainsi, un miARN peut cibler plusieurs ARNm, et un ARNm donné peut être la cible de plusieurs miARNs. Cette reconnaissance et/ou l'effet du miARN sur sa cible est conditionnée par des mécanismes particuliers comme l'édition des miARNs lors d'un stress cellulaire ou par l'intervention de cofacteurs protéiques. Inversement, la présence d'un facteur protéique peut empêcher la reconnaissance ou moduler l'action du miARN sur sa cible ARNm (**Figure 42**).

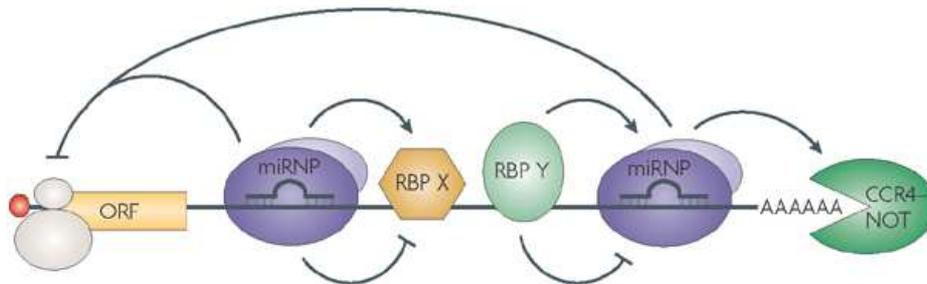


Figure 42 : Interactions possibles entre les RBPs et les micro-ribonucléoprotéines (miRNPs) (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008).

Un exemple de ce type d'interconnexion est le cas de miR-122 et de la protéine HuR, une ARE-BP (AU Rich Element Binding Protein). Dans des lignées de carcinomes hépatocellulaires, l'ARNm de CAT1 (Cationic Aminoacid Transporter 1) est inhibé traductionnellement par le microARN 122, et accumulé dans les P-bodies. En réponse à un stress cellulaire, la protéine HuR est transloquée du noyau vers le cytoplasme et, en se liant dans la partie 3'NT de CAT1, permet de relocaliser l'ARNm des P-bodies vers les polysomes où il sera traduit (Bhattacharyya, Habermacher et al. 2006). A l'inverse, une autre étude a montré que la protéine HuR est nécessaire à la répression de l'ARNm de c-myc par le miARN let-7, en favorisant le recrutement de la protéine AGO2 sur l'ARNm (Kim, Kuwano et al. 2009).

Il existe une très forte connectivité entre les miARNs et les ARE-BPs. Ces deux modes de régulation post-transcriptionnelle ont pour effet d'induire une répression traductionnelle et/ou une dégradation de l'ARNm (voir paragraphe II.C). Les mécanismes de régulation contrôlés par les AREs nécessitent le recrutement des machineries cellulaires impliquées dans le métabolisme des ARNm (exemple, enzymes intervenant dans l'enlèvement de la coiffe ou la dégradation du corps de l'ARNm). Or certaines d'entre elles sont également impliquées dans les mécanismes gouvernés par les miARNs.

C. Régulation par les éléments AU-Riches (ARE)

1. L'élément cis : l'ARE

Le motif d'instabilité le plus étudié dans les cellules de mammifères est l'ARE (AU-Rich Element), une séquence riche en résidus adénine et uridine présente dans la région 3'NT de nombreux ARNm. Ce sont des éléments *cis*-régulateurs qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel en induisant, pour la plupart, la dégradation des ARNm qui les portent (Barreau, Paillard et al. 2005). Plusieurs classes d'ARE ont été décrites, selon la présence et l'organisation du motif pentamérique AUUUA (**Figure 43**).

Group	Motif	Examples
I	WAUUUAW and a U-rich region	c-fos, c-myc
IIA	AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA	GM-CSF, TNF- α
IIB	AUUUAUUUAUUUAUUUA	Interferon- α
IIC	WAUUUAUUUAUUUAW	cox-2, IL-2, VEGF
IID	WWAUUUUUUUAWW	FGF2
IIE	WWWWAUUUUAWWWW	u-PA receptor
III	U-rich, non-AUUUA	c-jun

Figure 43 : Classification des éléments AREs associés à des exemples d'ARNm contenant ces séquences (Wilusz, Wormington et al. 2001).

L'absence ou la présence du pentamère AUUUA, isolé ou réitéré, chevauchant ou non, a permis une première classification des AREs en trois classes. La première classe correspond aux séquences contenant un motif pentamérique AUUUA localisé dans ou à proximité d'une région riche en U. La classe II correspond aux séquences contenant de un à plusieurs motifs AUUUA. Enfin la classe III correspond aux séquences contenant une région riche en U mais sans motif AUUUA (Xu, Chen et al. 1997). Ultérieurement, l'analyse bioinformatique des régions 3'NT, fondée sur la recherche du motif WWWU(AUUUA)UWWW (avec W = A ou U), a permis de subdiviser la catégorie II, contenant deux pentamères ou plus, en quatre groupes selon le nombre de pentamères présents (Bakheet, Frevel et al. 2001).

Il a été estimé par une approche bioinformatique que 5 à 8% des ARNm cellulaires pourraient contenir un ARE dans leur 3'NT (Bakheet, Williams et al. 2006). Ces ARNm codent généralement pour des gènes adaptatifs ou environnementaux qui sont exprimés de façon transitoire dans les cellules, comme les cytokines, les facteurs de croissance, les facteurs de transcription ou certaines enzymes du métabolisme (Bakheet, Frevel et al. 2001; Bakheet, Williams et al. 2003; Bakheet, Williams et al. 2006). Ils sont également retrouvés dans de nombreux ARNm codant pour des oncogènes comme c-fos, c-myc ou c-jun (Audic and Hartley 2004). Du fait que les AREs régulent l'expression de nombreux facteurs protéiques (cytokines, interleukines, facteurs transcriptionnels...), ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires (métabolisme, signalisation, prolifération, cycle cellulaire...) capables de répondre de façon transitoire ou adaptative aux signaux environnementaux. Ainsi la présence de mutations dans l'ARE ou la modification de l'expression des protéines s'y fixant, peuvent être à l'origine du développement de maladies (inflammation, cancer,...).

Les mécanismes de régulation d'expression génique associés aux AREs ne sont pas totalement connus. Cependant, la fonctionnalité de l'ARE dépend des facteurs *trans* protéiques qui s'y associent : les ARE binding proteins (ARE-BPs). Celles-ci peuvent stabiliser ou induire la dégradation des ARNm en interagissant avec les enzymes de la voie de dégradation des ARNm (Barreau, Paillard et al. 2005)(voir paragraphe II.A.2.b) ou par interconnexion avec la voie des miARNs (voir paragraphe II.B.2.c). De même la régulation traductionnelle des ARNm pourrait être

due à la capacité des ARE-BPs à interférer avec les protéines impliquées dans les processus de régulation de la traduction. Enfin les ARE-BPs pourraient influencer le devenir des ARNm en relocalisant ceux-ci dans les structures cytoplasmiques telles que les P-bodies, les granules de stress ou les polysomes.

2. L'élément trans : les ARE-BPs

La régulation par les AREs dépend de l'association de facteur *trans* régulateur : les ARE-BPs. De nombreux facteurs protéiques sont connus pour s'associer aux AREs (**Figure 44**). Certains favorisent l'activité déstabilisante des AREs sur les ARNm, d'autres ont plutôt pour effet de l'inhiber. Ainsi, c'est la nature des facteurs *trans*-régulateurs s'associant à un ARE qui va déterminer sa fonctionnalité et son efficacité (**Figure 44**).

ARE-BPs	mRNA stability		Protein expression Translational efficiency		Abundance	
	Increase	Decrease	Increase	Decrease	Up regulated	Down regulated
AUF1	c-myc (42) c-fos (42,67) PTH (56) GM-CSF (42) TNF-alpha (42)	c-myc (46) c-fos (53) p21 (48) Cyclin D1 (48) GM-CSF (53,54) IL-3 (55)				GM-CSF (55) IL-3 (55)
HuR	c-fos (59,63,67) MyoD (68) p21 (48,68,69) Cyclin A (70) Cyclin B1 (70) Cyclin D1 (48) NOS II/iNOS (64) GM-CSF (59) TNF alpha (65,74,139) Cox-2 (71,139) IL-3 (55,66) VEGF (62) Myogenin (68) TNF-alpha (74) GLUT1 (72) GAP-43 (75-77)		p53 (99,137)	TNF-alpha (139) Cox-2 (139)	p21 (69) Cyclin A (70) Cyclin B1 (70) NOS II/iNOS (64) GM-CSF (55) Cox-2 (71,173) IL-3 (55) VEGF (173) p53 (99,137)	TNF-alpha (139)
Hel-N1			NF-M (73) GLUT1 (72)		NF-M (73) GLUT1 (72) GAP-43 (75,76)	
HuD TTP		c-fos (90) GM-CSF (18, 81,83-85, 91) TNF-alpha (18,81,83-86,89,90) Cox-2 (87) IL-2 (82,90) IL-3 (18, 66, 83,84, 88) TNF-alpha (89,93) IL-3 (55,92,93)				GM-CSF (81) TNF-alpha (80) IL-2 (82) IL-3 (88)
BRF1						GM-CSF (55) IL-3 (55)
TIA-1				TNF-alpha (120) Cox-2 (121)		TNF-alpha (120) Cox-2 (121)
KSRP		c-fos (90,93) NOS II/iNOS (102) TNF-alpha (90,93) IL-2 (90,93) c-jun (93)				NOS II/iNOS (102)
CUG-BP2	Cox-2 (150)			Cox-2 (150)		Cox-2 (150)
Nucleolin	bcl-2 (175)					
TINO		bcl-2 (176)				
PAIP2	VEGF (177)				VEGF (177)	

Figure 44 : ARE-BPs et leur effet sur certains ARN messagers (Barreau, Paillard et al. 2005).

Certaines ARE-BPs, comme la tristetraproline (TTP), ont un effet répresseur sur l'expression des gènes en favorisant la dégradation ARE-dépendante de l'ARNm et en inhibant sa traduction. D'autres ARE-BPs, comme HuR, ont plutôt un effet inhibiteur sur la fonction des AREs. Le plus souvent une ARE-BP est associée à un mode de régulation, mais la nature de cette régulation peut être plus complexe. Une protéine peut avoir une fonction différente selon le type d'ARNm étudié ou le type cellulaire. De plus, différentes ARE-BPs peuvent agir en complexe sur un même ARNm pour définir son devenir fonctionnel. La nature de ces complexes n'est probablement pas statique, mais peut être cycle dépendant, changer avec la localisation de l'ARNm associé ou dépendre de stimuli externes. Un exemple pour illustrer cet aspect est le cas des protéines HuR et AUF1. Une étude a montré que les protéines HuR et AUF1 sont capables de lier simultanément une même population d'ARNm dans le noyau, mais elles s'associent à des populations distinctes d'ARNm dans le cytoplasme (Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004). Ainsi les ARNm pris en charge par HuR seront dirigés vers les polysomes pour être traduits, alors que les ARNm liés à AUF1 seront dirigés vers la machinerie de dégradation. En plus de l'aspect combinatoire de ce type de mécanisme, cette régulation montre l'importance de la localisation cellulaire de ces facteurs.

a) TIA1

La protéine TIA1 (T-cell-restricted Intracellular Antigen 1) est caractérisée par sa capacité à se fixer sur les ARE de certains ARNm (**Figure 44**). TIA1 se présente sous forme de deux isoformes issues d'un épissage alternatif contrôlé par la protéine TIAR (TIA1-related protein). Cette protéine possède trois domaines de liaison à l'ARN ou RRM (RNA Recognition Motifs) et un domaine riche en glutamine (également appelé Prion-related structure) en C terminal (**Figure 45**). Des analyses *in vitro* ont montré que le premier domaine est incapable de fixer des ARNm, le second domaine fixe préférentiellement les ARNm avec des séquences riches en U et le troisième domaine fixe les ARNm sans spécificité de séquence (Dember, Kim et al. 1996). Les conséquences fonctionnelles de l'inclusion ou de l'exclusion des 11 acides aminés dans le domaine RRM2 ne sont pas bien connues, mais on pourrait penser que ce

mécanisme d'épissage alternatif module la capacité de fixation de la protéine TIA1 sur ces cibles. La partie C terminale riche en glutamine confère à la protéine TIA1 la possibilité de s'auto-oligomériser *in vivo* pour former des micro-agrégats cytoplasmiques (Kedersha, Gupta et al. 1999).

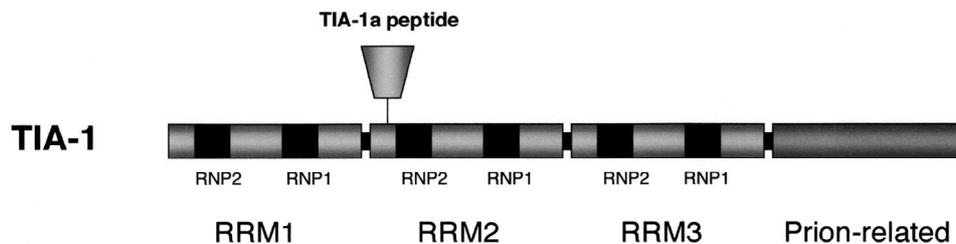


Figure 45 : Représentation schématique de la protéine TIA1 (Anderson and Kedersha 2002).

La protéine TIA1, comme la plupart des ARE-BPs, est localisée principalement dans le noyau, mais elle est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et en condition de stress cellulaire on la retrouve dans les granules de stress (voir paragraphe II.A.2.c). De façon générale, l'inhibition de la traduction initiée par TIA1 a pu être corrélée à des mécanismes de stress cellulaire (Förch and Valcárcel 2001). En effet, lors d'un stress, la sous-unité eIF2- α est phosphorylée, ce qui conduit à l'arrêt de la traduction de nombreux ARN messagers par la fixation d'un complexe de pré-initiation « silencieux ». La protéine TIA1 se fixerait ensuite à ce complexe de pré-initiation non-canonique et aux AREs de ces ARNm pour diriger ceux-ci vers les granules de stress (Anderson and Kedersha 2002) (**Figure 46**). Une fois dans les granules de stress, d'autres ARE-BPs comme HuR ou TTP détermineront le devenir fonctionnel de ces ARNm (dégradation ou stabilisation).

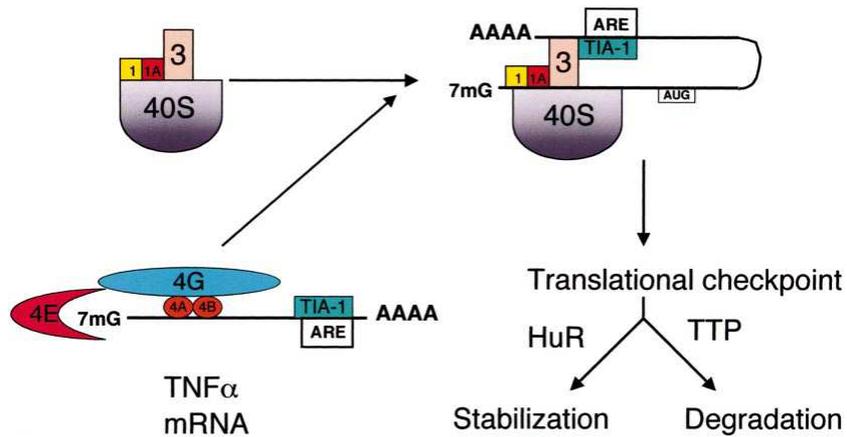


Figure 46 : Exemple de régulation de l'ARNm du TNF α par la protéine TIA1 (Anderson and Kedersha 2002).

En conclusion, TIA1 semble jouer un rôle de répresseur traductionnel en séquestrant des ARNm dans des granules cytoplasmiques spécifiques lors d'un stress cellulaire.

b) AUF1

La protéine AUF1 (AU-rich element RNA-binding protein 1) ou hnRNP D (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) est l'une des premières ARE-BPs décrites. Suite à un épissage alternatif de son ARNm, le pré-ARNm de AUF1 donne naissance à quatre isoformes : p37, p40, p42 et p45 (**Figure 47**). Toutes les isoformes contiennent deux domaines de liaison à l'ARN.

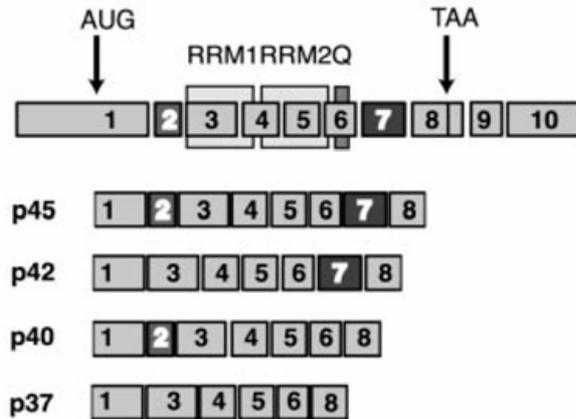


Figure 47 : Représentation schématique de l'ARNm de AUF1 et les différentes isoformes produites par épissage alternatif (Raineri, Wegmueller et al. 2004).

Il est généralement admis que la protéine AUF1 a un effet sur l'expression génique en favorisant la dégradation de l'ARNm. Cependant, aucune activité endo ou exonucléase n'a pu être associée à cette protéine. Ceci suggère que l'effet régulateur de la protéine AUF1 nécessite le recrutement de la machinerie de dégradation des ARNm. Ce recrutement pourrait se faire via son domaine d'interaction protéine-protéine, riche en glutamine et localisé en C terminal.

Son expression est majoritairement nucléaire avec une localisation différentielle suivant les isoformes : p42 et p45 ont plutôt une localisation nucléaire, alors que p37 et p40 se retrouvent majoritairement dans le cytoplasme, laissant sous-entendre des fonctions spécifiques à chaque isoforme. Elle a également la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme via une NLS (Nuclear Localization Sequence) présente au niveau de son extrémité C terminale (Sarkar, Lu et al. 2003). Son import nucléaire est une étape nécessaire à sa fonction cytoplasmique et son rôle dans la dégradation ARE-dépendante (Chen, Xu et al. 2004). Finalement, elle peut être phosphorylée, et son état de phosphorylation conditionne la reconnaissance de l'ARE, et donc ses propriétés fonctionnelles (Wilson, Lu et al. 2003; Blum, Samarel et al. 2005).

L'existence des quatre isoformes d'AUF1 complique l'étude de son rôle dans la fonction des AREs. Les études réalisées par différents groupes montrent qu'AUF1

peut potentialiser ou inhiber la régulation ARE-dépendante (**Figure 44**). Ces résultats paradoxaux semblent être dus à des fonctions opposées des différentes isoformes (Raineri, Wegmueller et al. 2004). Par une approche d'ARN interférence, il a été démontré que la diminution d'expression des isoformes p40 et p45 ont un effet stabilisant sur un ARNm contenant un ARE, alors que la diminution de l'ensemble des isoformes n'a aucun effet. D'après ces auteurs, l'isoforme p40 serait responsable de l'induction de la dégradation et c'est le rapport d'expression des ces différentes isoformes qui conditionnerait la demi-vie de l'ARNm. Une autre étude a montré que AUF1 peut rentrer en compétition avec une autre ARE-BP, la protéine TIAR, sur l'ARE de c-myc, et qu'elle permet dans ces conditions de favoriser sa traduction (Liao, Hu et al. 2007) (**Figure 48**).

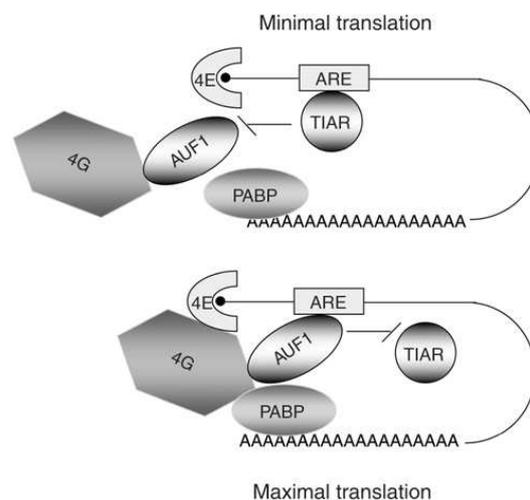


Figure 48 : Exemple de régulation d'AUF1 sur la traduction de c-myc (Liao, Hu et al. 2007).

De nombreux ARNm sont décrits comme étant régulés par la protéine AUF1 (Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004; Barreau, Paillard et al. 2005; Mazan-Mamczarz, Kuwano et al. 2009). Ce sont des gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, comme des protooncogènes (c-fos, c-myc et c-jun), des facteurs de croissance (GM-CSF et VEGF), des cytokines (TNF alpha) et des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Cycline A, B1, D1 et p21).

c) *HuR*

HuR (Hu antigen R) appartient à la famille protéique ELAV (Embryonic Lethal, Abnormal Vision) qui est composée de 3 autres membres : HuB, HuC et HuD. Cette protéine a une expression ubiquitaire, contrairement aux autres membres de cette famille qui sont plutôt exprimés dans le tissu nerveux (Good 1995). Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la fonction et dans la destinée des ARN sur lesquels elles se fixent. Les protéines Hu sont impliquées dans diverses étapes de la régulation post-transcriptionnelle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Hinman and Lou 2008) (*Figure 49*).

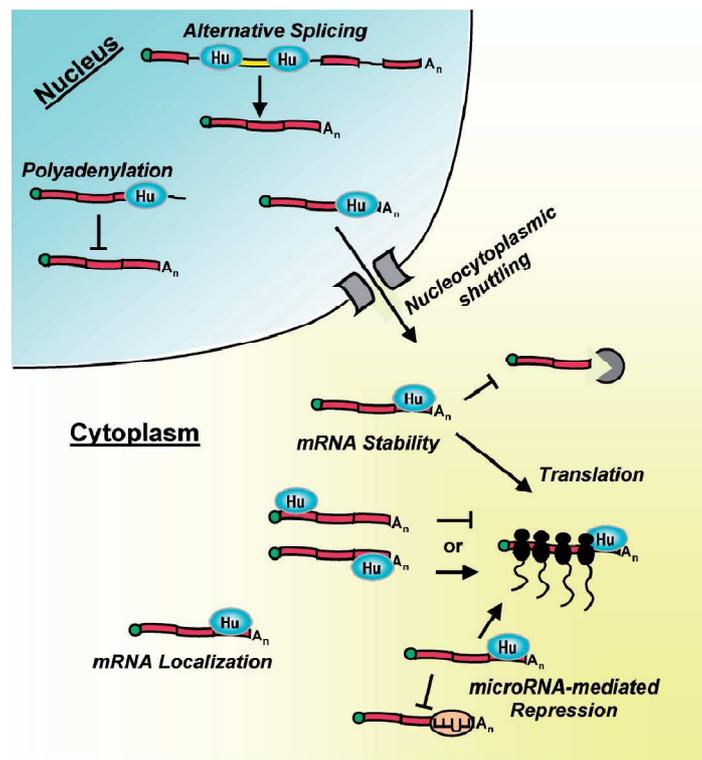


Figure 49 : Divers mécanismes impliquant les protéines Hu (Hinman and Lou 2008).

Par la suite je m'intéresserai plus particulièrement à la protéine HuR ou ELAVL1, et à son rôle cytoplasmique dans un contexte physiopathologique.

D. *HUR et Cancer*

1. *Structure*

HuR est une protéine de 36kDa qui contient trois domaines de liaison à l'ARN (RRM) et un domaine Hinge ou HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence) situé entre les domaines RRM2 et RRM3 (*Figure 50*). Cette séquence Hinge contient à la fois un signal de localisation nucléaire et un signal d'export nucléaire permettant à la protéine de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (voir paragraphe II.D.2).

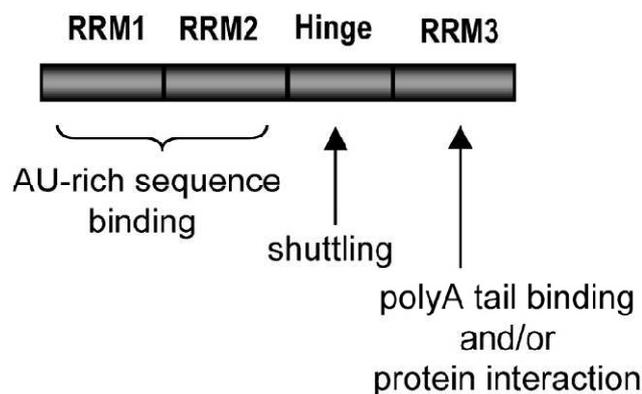


Figure 50 : Représentation schématique de la protéine HuR (Hinman and Lou 2008).

Les domaines RRM1 et RRM2, impliqués dans la reconnaissance des AREs, coopèrent pour former une « poche » à travers laquelle l'ARN est fixé entre des feuillets β (Wang and Tanaka Hall 2001). Le domaine RRM3 ne participe pas directement à la reconnaissance des séquences AU-rich, mais il est nécessaire pour l'effet stabilisateur d'HuR sur ces cibles (Hinman and Lou 2008). En effet le domaine RRM3 comme le domaine Hinge participeraient dans le maintien de la stabilité du complexe ARN-protéine, en permettant l'oligomérisation des protéines HuR sur sa cible (Fialcowitz-White, Brewer et al. 2007).

2. *Modification post-traductionnelle et localisation sub-cellulaire d'HuR*

La protéine HuR est principalement nucléaire et il a été montré qu'elle pouvait être impliquée dans l'épissage alternatif du pré-ARNm codant pour le récepteur à l'apoptose FAS (Izquierdo 2008) ; cependant les fonctions nucléaires d'HuR restent encore obscures. La capacité d'HuR à stabiliser et/ou à moduler la traduction de nombreux ARNm est étroitement liée à sa translocation dans le cytoplasme (Hinman and Lou 2008). Le transport d'HuR à travers l'enveloppe nucléaire nécessite des modifications post-traductionnelles au niveau du domaine HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence) (*Figure 51*) ainsi que des transporteurs nucléaires (Abdelmohsen and Gorospe 2010).

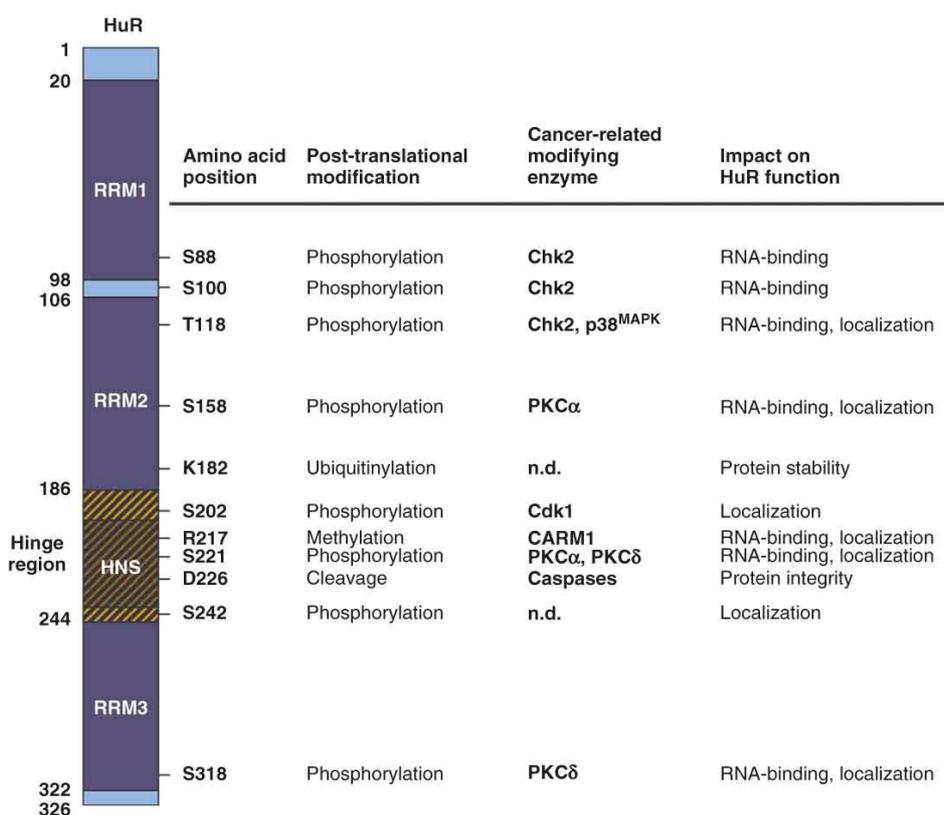


Figure 51 : Représentation schématique de la protéine HuR et les modifications post-traductionnelles affectant sa fonction (Abdelmohsen and Gorospe 2010).

La capacité qu'a HuR à moduler les niveaux d'ARNm (stabilité et/ou traduction) dépend d'une grande hétérogénéité de stimuli endogènes comme les cytokines, les facteurs de croissances, les médiateurs de l'inflammation et les hormones, et de stimuli externes comme l'irradiation aux UV, l'hypoxie, les carences en nutriments et les stress oxydatifs. Tous ces stimuli vont ensuite, par une cascade de signalisation, aboutir à des modifications post-traductionnelles d'HuR (*Figure 51*) et ainsi influencer sur sa fonction d'une part en agissant sur la localisation cellulaire de la protéine et d'autre part en modifiant son affinité pour ses cibles (Doller, Pfeilschifter et al. 2008). Les mécanismes moléculaires de ces voies de signalisation ne sont pas très bien connus car ils sont souvent spécifiques au stimulus et aux types cellulaires où les populations d'ARNm régulés par HuR ne sont pas nécessairement les mêmes.

En conclusion, les modifications post-traductionnelles exercées sur la protéine HuR telles que la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitinylation, participent activement à la fonctionnalité d'HuR en modulant sa localisation cellulaire et sa capacité à se fixer sur les transcrits.

3. Fonction

Par sa capacité à fixer plus de 200 ARNm différents (Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004), HuR semble impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la différenciation, la réponse aux dommages cellulaires et la réponse immune et inflammatoire (Lopez de Silanes, Lal et al. 2005; Hinman and Lou 2008). En outre, HuR est de plus en plus reconnue comme un facteur central dans l'expression des gènes liés au cancer. Cette fonction est liée à la capacité d'HuR à favoriser le phénotype cancéreux en avantageant l'expression de gènes codant pour des protéines qui augmentent la prolifération, inhibent l'apoptose, favorisent l'angiogenèse, réduisent la réponse immunitaire et facilitent l'invasion cellulaire (*Figure 52*).

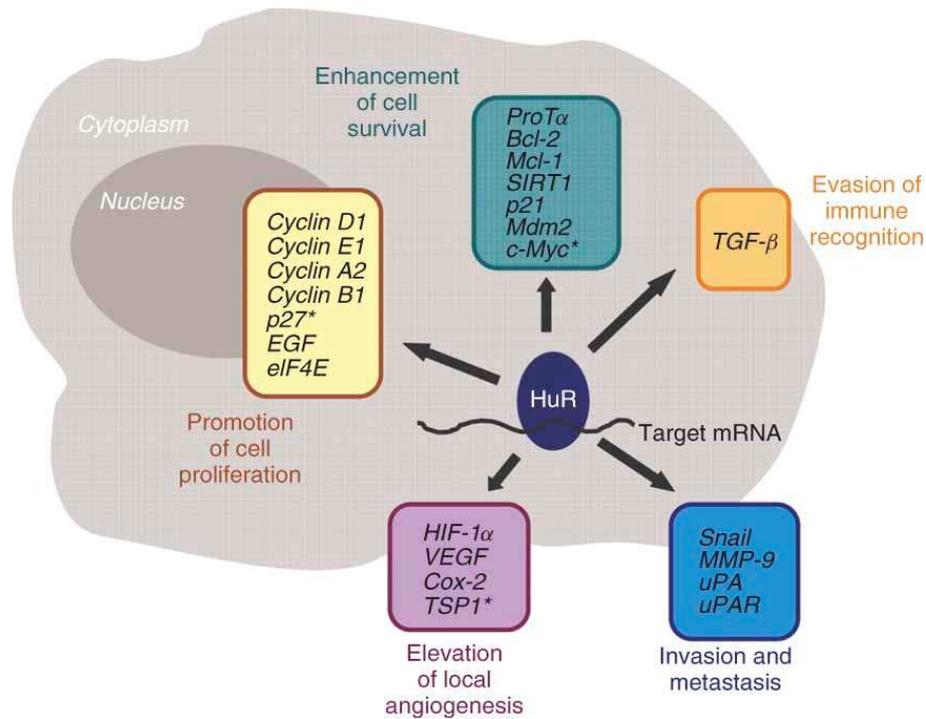


Figure 52 : Rôle d’HuR dans le phénotype cancéreux (Abdelmohsen and Gorospe 2010).

De plus, une étude a montré que des lignées cellulaires humaines de carcinome colorectal (RKO) surexprimant la protéine HuR prolifèrent plus rapidement en culture, et produisent des tumeurs significativement plus larges avec une croissance plus rapide après injection sous-cutanée dans des souris. A l’inverse des cellules RKO où HuR a été diminué par siARN, se divisent plus lentement en culture et produisent des tumeurs plus petites chez les souris (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003).

a) *Promotion de la prolifération cellulaire*

HuR augmente le niveau d’expression de nombreux régulateurs du cycle cellulaire, et en particulier les cyclines, qui activent les Cdks (Cyclin-Dependents Kinase) durant les différentes phases du cycle cellulaire (**Figure 53**).

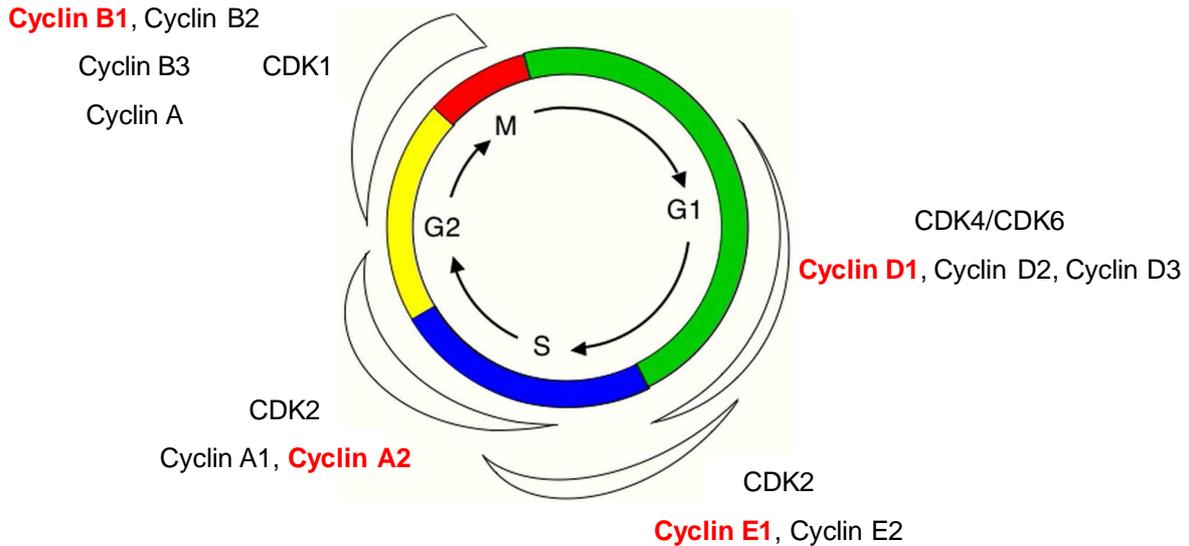


Figure 53 : Représentation schématique du cycle cellulaire associée à l'activité des cyclines et des Cdk, les cyclines régulées par HuR sont indiquées en rouge. Adapté de (van den Heuvel 2005).

Différentes études réalisées dans différents cancers (col de l'utérus, sein et colon), ont permis de montrer que HuR est capable de se lier sur l'extrémité 3'NT des ARNm codant pour les cyclines B1, D1, E1 et A2, ce qui a pour effet de favoriser leur expression en stabilisant leur ARNm (Wang, Caldwell et al. 2000; Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004; Guo and Hartley 2006; Guo, Wu et al. 2010). Ainsi, HuR a la capacité d'agir sur les différentes phases du cycle cellulaire. Les cyclines étant les activateurs essentiels des Cdk, les temps des différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) seront raccourcis, ce qui aura pour conséquence une accélération du cycle cellulaire et une expansion de la population tumorale.

En plus de promouvoir l'expression de gènes qui favorisent la prolifération cellulaire, HuR inhibe la traduction de p27 qui est un facteur pro-apoptotique et qui a la capacité d'inhiber Cdk2 et donc le cycle cellulaire (Kullmann, Göpfert et al. 2002).

b) Résistance à l'apoptose

Une autre fonction d'HuR est de favoriser la survie cellulaire. Cet effet protecteur est dû, en partie, à sa capacité à favoriser l'expression de gènes anti-apoptotiques,

permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à une mort programmée (Abdelmohsen, Lal et al. 2007) (**Figure 54**).

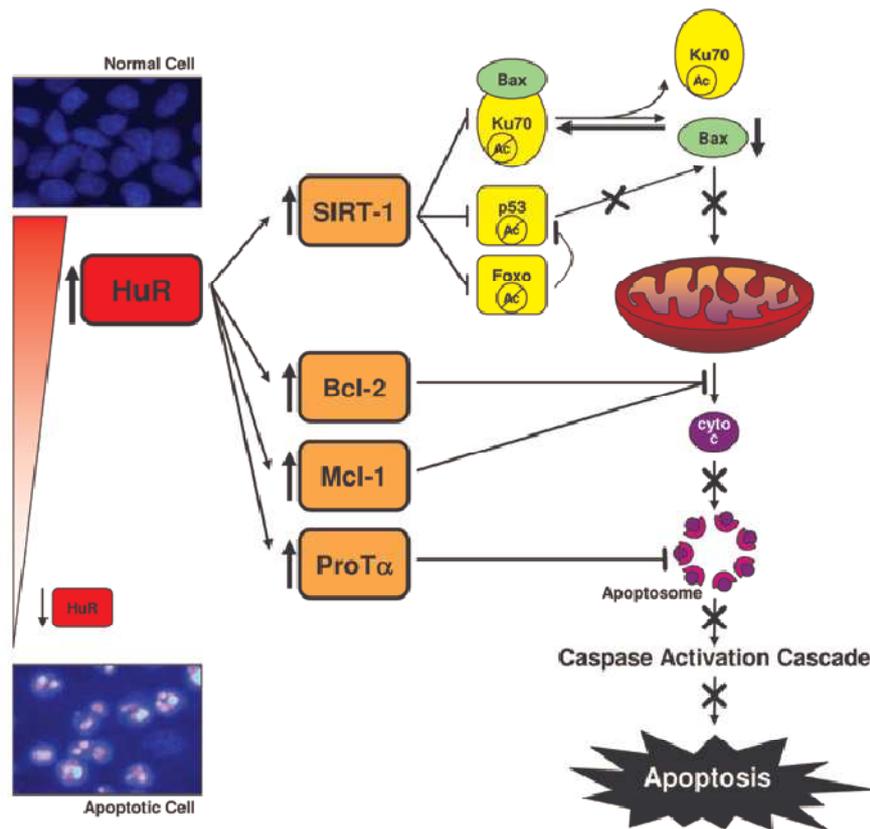


Figure 54 : Représentation schématique de l'influence d'HuR sur la voie apoptotique (Abdelmohsen, Lal et al. 2007).

HuR peut agir sur la voie en amont de la mitochondrie, en augmentant le niveau d'expression de SIRT1, qui va déacétyler les facteurs pro-apoptotiques Ku70, p53 et FOXO-3a, et prévenir la perméabilisation de la membrane mitochondriale médiée par Bax. La protéine HuR agit également sur la voie en aval de la mitochondrie, en empêchant d'une part la libération du cytochrome C par la stabilisation des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) et Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1), et d'autre part en inhibant la formation de l'apoptosome en augmentant l'expression de ProTα (Prothymosin α).

Le rôle d'HuR dans la résistance à l'apoptose est renforcé par son action sur c-myc, un facteur de transcription pro-apoptotique. En effet, la traduction de l'ARNm de c-myc est inhibé par l'action conjointe de HuR et du miARN let-7 (Kim, Kuwano et al. 2009).

c) *Augmentation de l'angiogenèse*

HuR participe à la mise en place d'un profil d'expression génique, en réponse à l'hypoxie, en se fixant à la fois dans la région 5'NT et 3'NT de l'ARNm HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α) ce qui permet de stabiliser le transcrite et d'augmenter sa traduction (Sheflin, Zou et al. 2004; Galban, Kuwano et al. 2008). Le facteur HIF-1 α joue un rôle clé dans l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes qui permettent à la cellule de s'adapter aux conditions hypoxiques (Masuda, Abdelmohsen et al. 2009) (*Figure 55*).

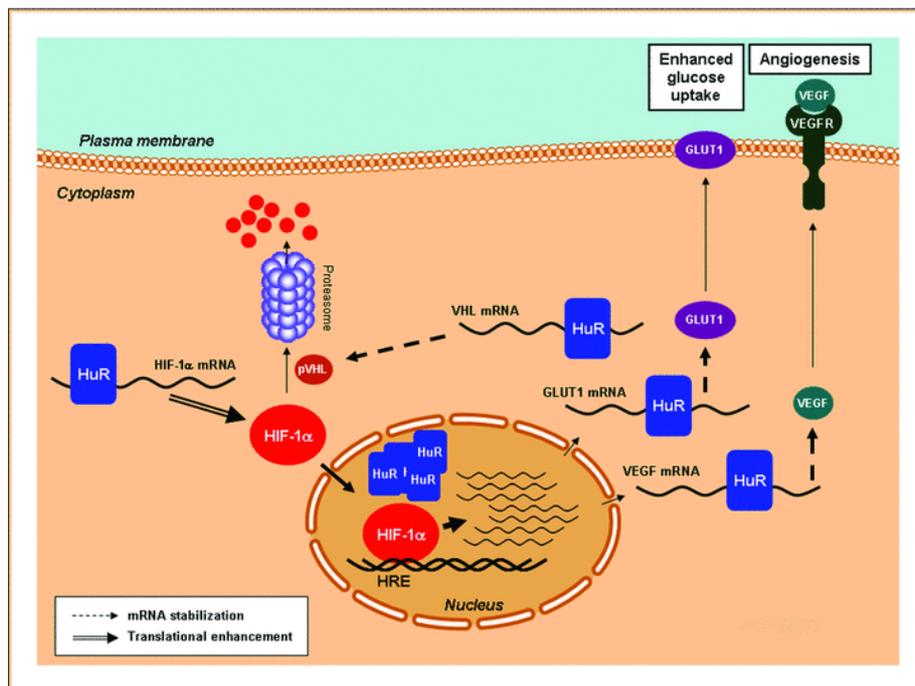


Figure 55 : Rôle d'HuR dans la mise en place de la réponse cellulaire d'adaptation à l'hypoxie (Masuda, Abdelmohsen et al. 2009).

Le facteur de transcription HIF-1 α , en se fixant sur les séquences HRE (hypoxia-response element), activera la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse mais également dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et le métabolisme du glucose, permettant à la cellule de s'adapter au stress provoqué par l'hypoxie (Semenza 2000). HuR va assister HIF-1 α dans la surexpression de certains gènes en augmentant la stabilité et/ou la traduction de leurs ARNm (*Figure 55*). Parmi ces transcrits on trouve par exemple le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Levy, Chung et al. 1998; Wang, Zhao et al. 2009), qui joue un rôle important dans l'angiogenèse, la croissance, la prolifération et la migration cellulaire. Il est intéressant de noter que HuR régule aussi l'ARNm VHL, qui participe à la dégradation de HIF-1 α via le protéasome. Ainsi HuR pourra aider à l'arrêt de la réponse hypoxique une fois que la cellule aura retrouvé des conditions basales (Masuda, Abdelmohsen et al. 2009).

HuR favorise aussi l'angiogenèse en diminuant l'expression de la thrombospondine 1 (TSP1) qui est connue pour être un suppresseur de tumeur et un inhibiteur de l'angiogenèse (Watnick, Cheng et al. 2003). De façon intéressante HuR augmente la traduction de TSP1, la réduction du niveau de protéine TSP1 dans le cancer est en fait due à une réduction de l'association d'HuR avec l'ARNm de TSP1, de manière proportionnelle avec le phénotype tumoral (Mazan-Mamczarz, Hagner et al. 2008).

d) Réduction de la réponse immunitaire

La surveillance par le système immunitaire conduit à l'élimination des cellules tumorales. Par conséquent, pour assurer leur prolifération, les cellules cancéreuses doivent mettre en place des mécanismes leur permettant d'échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires. Les exemples décrivant l'intervention d'HuR dans ce processus sont assez rares. Toutefois, il a été montré que HuR favorisait l'expression de MKP-1 (Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1) en jouant à la fois sur la stabilité et la traduction de son ARNm (Kuwano, Kim et al. 2008). La protéine MKP-1 est connue pour inhiber la voie MAPK (MAP-kinase) en

déphosphorylant les facteurs JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38, limitant ainsi la biosynthèse de cytokines pro-inflammatoires (Wang and Liu 2007).

Le TGF- β est une cytokine avec des fonctions pléiotropiques, impliquée dans de nombreux processus physiologiques : prolifération cellulaire, différenciation et apoptose. Le TGF- β joue aussi un rôle important dans l'immunité en permettant aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire (Beck, Schreiber et al. 2001). Dans les cancers, l'expression du TGF- β est augmentée par la fixation d'HuR sur son ARNm (Nabors, Gillespie et al. 2001), favorisant ainsi le développement des cellules cancéreuses.

e) Promotion de l'invasion

Les cellules tumorales peuvent éventuellement envahir les tissus adjacents et coloniser les tissus distants pour former des métastases. Ces processus impliquent des changements dans l'interaction des cellules cancéreuses avec leur environnement local et l'action de protéases extracellulaires. HuR participe à l'invasion et à l'augmentation du potentiel métastatique en stabilisant le facteur de transcription Snail (Dong, Lu et al. 2007). Snail est connu pour induire la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) à travers la répression de facteurs épithéliaux comme la E-cadherin et les cytokératines et l'induction de protéines mésenchymateuses comme la fibronectine et les métalloprotéases (Peinado, Olmeda et al. 2007). La perte du phénotype épithélial pour le phénotype mésenchymateux est associée à la progression tumorale et à l'augmentation du potentiel métastatique.

De plus, HuR stabilise l'ARNm MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), augmentant ainsi le taux de la protéine dans les cancers (Akool, Kleinert et al. 2003; Huwiler, Akool et al. 2003). La MMP-9 en dégradant la matrice extracellulaire (collagènes, laminine, fibronectine, vitronectine et protéoglycanes), favorisera l'invasion des cellules tumorales. HuR facilite également le processus de dégradation de la matrice extracellulaire en augmentant l'expression de uPA (urokinase-type plasminogen

activator) et son récepteur uPAR (uPA receptor) (Tran, Maurer et al. 2003). Ces deux protéines font partie d'un système sérine protéinase présent à la surface des cellules qui permet l'activation du plasminogène en plasmin, qui à son tour entraînera une cascade de signalisation provoquant la dégradation de la matrice extracellulaire, l'activation de métalloprotéinases, l'activation et le relargage de facteurs de croissance (Mazar 2008).

4. Expression

L'expression de la protéine HuR a été analysée sur plus de 182 tumeurs par marquage immunohistochimique (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003) (*Figure 56*). Il ressort de cette étude que le taux de protéine HuR est largement augmenté dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus non tumoraux. La protéine HuR est principalement retrouvée dans le noyau, de manière faible à modérée, dans tous les tissus non tumoraux, avec une exception pour les tissus non tumoraux de foie provenant de patients atteints de cirrhose qui présentent un fort niveau d'HuR cytoplasmique. A l'inverse, dans les tissus tumoraux le taux de protéine HuR est fortement augmenté avec une présence accrue dans le cytoplasme (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003).

La seule étude quantitative à avoir analysé le niveau de la protéine HuR dans le CHC n'a été réalisée que récemment (Vazquez-Chantada, Fernandez-Ramos et al. 2010). Dans cette étude les auteurs ont quantifié le taux de protéine HuR par immunofluorescence sur 22 tissus tumoraux et l'ont comparé à 4 tissus normaux. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence une augmentation du niveau de la protéine HuR dans les tissus tumoraux hépatiques aux alentours de 5 fois.

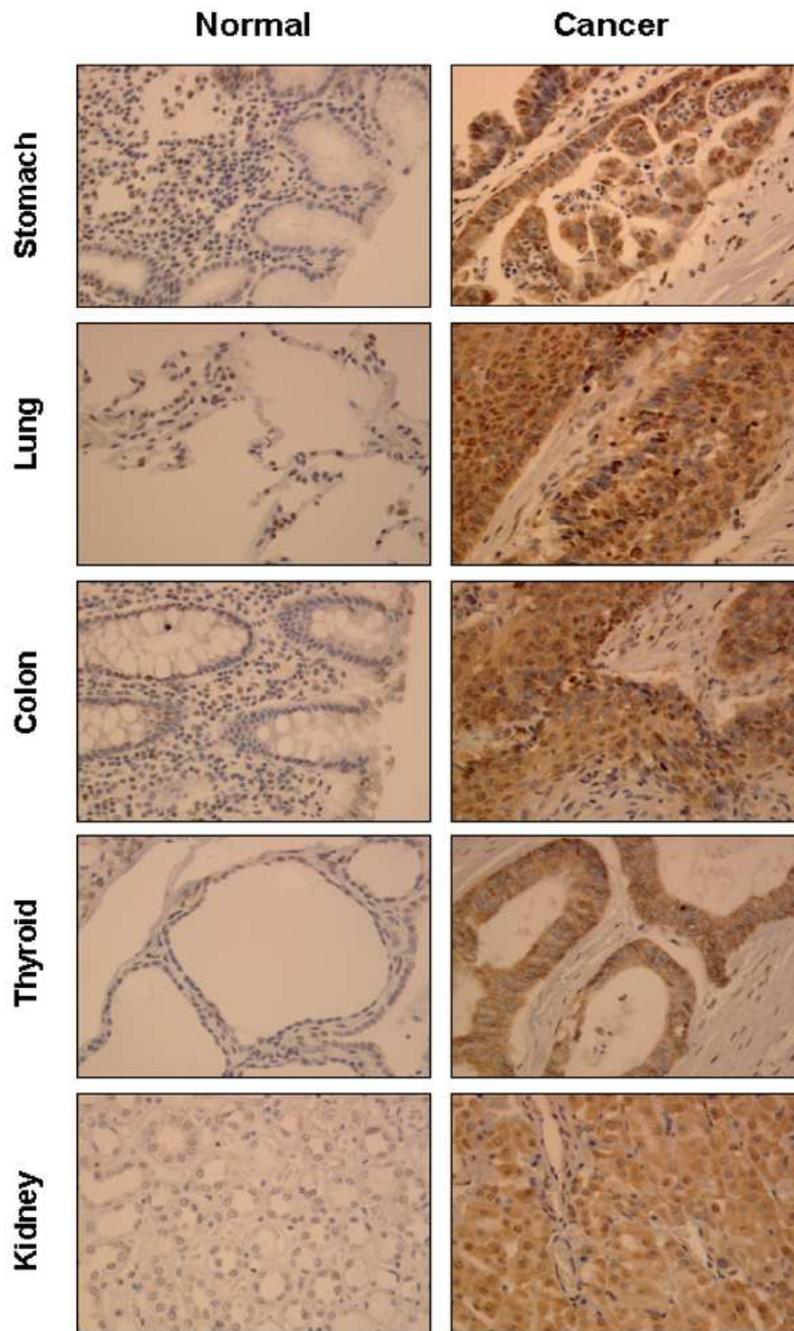


Figure 56 : Marquage immunohistochimique de la protéine HuR dans différents tissus tumoraux et normaux humains (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003).

Les origines de l'augmentation des niveaux protéiques d'HuR dans les cancers ne sont pas connues. Cependant quelques hypothèses peuvent être avancées, comme d'une part le fait que l'ARNm d'HuR soit soumis à des régulations post-transcriptionnelles (Pullmann, Kim et al. 2007) ; d'autre part le gène codant pour HuR est situé dans une région chromosomique (chr19p13.2) où les gènes sont

fréquemment surexprimés dans le CHC (donnée extraite du site Oncogenomic Database of Hepatocellular Carcinoma). Ainsi, toutes ces données vont bien dans le sens d'une surexpression de la protéine HuR dans le CHC.

Des études récentes ont recherché dans différents cancers des corrélations possibles entre le niveau d'HuR dans les tissus et le grade de la tumeur mais aussi la possible valeur diagnostique, pronostique et thérapeutique de la protéine. Ainsi l'augmentation du niveau de la protéine HuR dans le cytoplasme est associée à des tumeurs de haut grade, de grande taille et présentant une activité mitotique importante dans le cancer du sein (Heinonen, Bono et al. 2005; Heinonen, Fagerholm et al. 2007), le cancer colorectal (Denkert, Koch et al. 2006), le cancer des ovaires (Erkinheimo, Lassus et al. 2003; Denkert, Weichert et al. 2004), le cancer de la prostate (Niesporek, Kristiansen et al. 2008; Barbisan, Mazzucchelli et al. 2009), le cancer de la cavité buccale (Cho, Han et al. 2007) et le cancer de l'estomac (Mrena, Wiksten et al. 2005). Une étude réalisée sur le cancer des ovaires a montré que l'augmentation du niveau d'HuR nucléaire était également associée à des tumeurs de haut grade et à un mauvais pronostic. La protéine HuR est maintenant considérée comme un facteur pronostique important et un marqueur de survie pour les patients atteints de ces cancers.

OBJECTIFS

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif du foie le plus fréquent. Il se place en cinquième position des cancers les plus fréquents au monde et son incidence mondiale est en constante progression, en particulier depuis quelques années avec l'apparition de nouveaux facteurs de risque comme l'obésité. Le diagnostic du CHC est souvent obtenu à des stades avancés de la maladie quand les solutions thérapeutiques (transplantation hépatique, résection chirurgicale) sont limitées. C'est pourquoi le CHC se classe en troisième position des causes de décès par cancer dans le monde. La recherche de nouvelles cibles, basée sur une meilleure compréhension des processus cellulaires responsables de la carcinogenèse hépatique, reste une priorité dans la lutte contre ce type de cancer.

Comme nous l'avons vu, l'expression de nombreux gènes, conférant un avantage sélectif aux cellules cancéreuses (prolifération cellulaire accrue, résistance à l'apoptose, motilité augmentée,...), est profondément altérée dans les cellules tumorales de CHC. Des travaux récents ont montré que, dans le CHC, 40 à 50% des modifications d'expression génique ne seraient dues ni à des dysfonctionnements transcriptionnels, ni à des anomalies génomiques, mais pourraient découler d'une altération des mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle.

Mon travail de thèse s'inscrit dans la démarche de mieux comprendre l'implication de la régulation post-transcriptionnelle dans le carcinome hépatocellulaire. Pour cela, la protéine HuR a été choisie comme modèle d'étude. Cette protéine, impliquée dans la régulation de la stabilité et/ou de la traduction de nombreux ARNm, est connue pour sa contribution dans le développement du cancer du sein ou du colon. Or, son rôle dans la carcinogenèse hépatique est encore mal connu. Dans un premier temps, mon travail a consisté à évaluer le niveau d'expression d'HuR dans le CHC. Dans un deuxième temps, le rôle de la protéine dans la carcinogenèse hépatique a été étudié par une approche visant à identifier l'ensemble des ARNm régulés par HuR dans le CHC. A terme, les objectifs seront de mieux caractériser les voies moléculaires oncogéniques influencées par HuR, ce qui pourrait donner lieu à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du CHC. HuR pourrait, elle-même, constituer une telle cible (Meisner, Hintersteiner et al. 2007).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels

A. Lignées cellulaires et conditions de culture

1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées dans ce travail et leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant (**Tableau 1**).

Lignées	Voie Wnt/ β -caténine	Gène β -caténine (Exon 3)	Voie p53	Gène p53	Voie rétinoblastome	Caractéristique	Etiologie
Huh7	Normal	wt	p53 (Y220C)	Y220C	Normal	CHC/57 ans (♂)	HBV-
HepG2	activated	β -catenin (Δ 25–140/wt)	Normal	wt	Normal	CHC/15 ans (♂)	HBV-
Huh6	activated	β -catenin (G34S)	Hépatoblastome	HBV+
SNU 398	activated	β -catenin (S37C/wt)	...	p53 -/-	...	CHC/42 ans (♂)	HBV+
SNU 475	Normal/Axin1 (HD)	wt	p53 (N239D/C275R/N288S)	...	p16INK4a (PM)	CHC/43 ans (♂)	HBV+
Hep3B	Normal	wt	p53 (HD)	p53 -/-	pRb (undetected)	CHC/8 ans (♂)	HBV+
H2P	...	wt	CHC primaire/42 ans (♂)	HBV-
H2M	...	wt	CHC métastase/42 ans (♂)	HBV-

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées pour l'étude. HD : délétion hétérozygote, PM : hyperméthylation du promoteur.

Des hépatocytes fraîchement isolés ont été utilisés. Ces cellules provenant de Biopredic SA (Rennes) ont été purifiées sur gradient de Percoll puis directement lysées pour récupérer les protéines.

2. Milieux et conditions de culture

Les cellules HuH7, HepG2, HuH6, Hep3B, H2P et H2M ont été cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) à 4,5g/L de glucose contenant 10% de sérum de veau fœtal et un mélange de pénicilline (100U/mL), de streptomycine (100 μ g/mL) et de L-Glutamine (2mM). Les cellules SNU398 et

SNU475 ont été cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) contenant 10% de sérum de veau foetal et 2% d'un mélange de pénicilline (100U/mL), de streptomycine (100µg/mL) et de L-Glutamine (2mM). Les cellules ont été incubées à 37°C avec une teneur en CO₂ de 5%.

B. Tissus hépatiques humains

L'étude de l'expression de la protéine HuR a été réalisée sur des tissus hépatiques humains provenant de 27 patients atteints de CHC (**Tableau 2**) et de 3 patients ne présentant pas de CHC : un patient atteint d'une hyperplasie nodulaire focale (HNF), un patient atteint de cirrhose et un patient sain.

Caractéristiques cliniques	Valeurs
Age (moyenne)	66,7 ± 9,9 ans
Genre (masculin)	78%
Infection VHB	7%
Infection VHC	33%
Alcool	7%
Syndrome métabolique	22%
Non déterminé	33%
Activité inflammatoire (sur 3)	
0	26%
1	44%
2	30%
Score fibrose (sur 4)	
0	15%
1	11%
2	15%
3	18%
4	41%
Grade Edmondson(sur 4)	
1	4%
2	19%
3	63%
4	11%

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des patients (n=27).

Pour chaque patient, les échantillons tumoraux et péri-tumoraux (à une distance d'au moins 2cm de la tumeur) ont été récupérés et immédiatement congelés en azote liquide puis conservés à -80°C. Des prélèvements ont également été effectués pour l'inclusion des tissus en paraffine pour les analyses immunohistologiques.

C. Anticorps

Les références des anticorps utilisés pour les western-blot ainsi que les dilutions utilisées sont présentées dans le tableau suivant (

Tableau 3).

Protéine	Source	Référence	Distributeur	Dilution
HuR	monoclonal de souris	sc-5261(3A2)	Santa Cruz	1/1000 ^{ème}
U1snRNP70K	polyclonal de lapin	ARP40276_T100	Aviva	1/1000 ^{ème}
GAPDH	polyclonal de lapin	sc-25778(FL-335)	Santa Cruz	1/2000 ^{ème}
Tubuline	monoclonal de souris	T-6074	Sigma	1/10000 ^{ème}

Tableau 3 : Références et conditions d'utilisation des anticorps utilisés en western-blot.

La révélation des anticorps primaires a été effectuée par des anticorps secondaires couplés à des fluorophores visibles dans l'infra-rouge (680 et 700nm). Ces anticorps proviennent de la compagnie Li-Cor Biotechnology (référence 926-32210 et 926-32220 pour les anti-souris et 926-32211 et 926-32221 pour les anti-lapin) et sont utilisés à une dilution de 1/5000^{ème}.

Pour les réactions d'immunoprécipitation de la protéine HuR, la purification de la protéine a été effectuée avec l'anticorps monoclonal Santa-Cruz sc-5261(3A2). L'anticorps non spécifique du même isotype a été utilisé comme contrôle : IgG1, kappa [MOPC-21] monoclonal de souris provenant de Abcam (ab18443). Les deux anticorps ont été utilisés à 4µg d'anticorps pour 100µg de protéines totales.

Les marquages immunohistologiques de la protéine HuR ont été réalisés avec l'anticorps décrit précédemment à une dilution de 1/250^{ème}. L'anticorps secondaire utilisé pour la révélation est l'anticorps Envision Mouse Dako (K4001).

D. Oligonucléotides

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés pour quantifier le niveau d'ARNm d'HuR par qRT-PCR dans les tissus hépatiques humains :

- HuR-R4 : 5'-CGTGTTGATCGCTCTCTCTG-3'
- HuR-L4 : 5'-CCCAGGATGAGTTACGAAGC-3'
- 18S(206) : 5'-GCCATGCATGTCTGAGTACG-3'
- 18S(207) : 5'-CCGTCGGCATGTATTAGCTC-3'

Les oligonucléotides HuR ont été utilisés à une concentration finale de 150nM et les oligonucléotides 18S, servant à la normalisation, ont été utilisés à 200nM.

L'analyse des ARNm fixés par la protéine HuR, dans les expériences d'immunoprécipitation, a été réalisée par qRT-PCR avec les oligonucléotides suivant utilisés à 150nM final et ciblant la région codante des ARNm:

- ACTB-R : 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'
- ACTB-L : 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'
- GAPDH-R : 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
- GAPDH-L : 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Pour finir, les oligonucléotides utilisés pour vérifier le niveau d'enrichissement en ACTB après le deuxième cycle d'amplification des ARNm avant l'étape d'hybridation sur puces, sont présentés ci-dessous :

- ACTB-R1 : 5'-ATGCTATCACCTCCCCTGTG-3'
- ACTB-L1 : 5'-GGAAGTCCCTTGCCATCCTA-3'
- GAPDH-R2 : 5'-TGTGAGGAGGGGAGATTCAG-3'
- GAPDH-L2 : 5'-CCAGCAAGAGCACAAGAGGA-3'

Ces oligonucléotides ont été dessinés pour reconnaître la région 3'NT des ARNm et ont été utilisés à une concentration finale de 100nM.

Tous les oligonucléotides ont été utilisés à une température d'hybridation de 60°C.

E. siARNs

L'extinction de la protéine HuR dans les cellules HuH7 a été effectuée par transfection transitoire des cellules avec un mélange de 3 siARNs dirigés contre l'ARNm d'HuR. Les séquences sont représentées ci-dessous :

- siHuR1 : 5'-AACAUAGACCCAGGAUGAGUUATT-3'
- siHuR2 : 5'-AAGCCUGUUCAGCAGCAUUGGTT-3'
- siHuR3 : 5'-UCUUAAGUUUCGUAAGUUATT-3'

Les siHuR1 et siHuR2 ciblent la phase codante tandis que le siHuR3 cible la région 3'NT de l'ARNm d'HuR.

En parallèle, les cellules ont été transfectées avec un siARN contrôle ciblant l'ARNm de la luciférase, non exprimé dans les cellules :

- siLUC : 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA-3'

F. Puces à ADN

L'analyse des cibles fonctionnelles de la protéine HuR a été réalisée sur puces Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Ces puces contiennent plus de 54000 jeux de sondes avec 11 sondes par jeu, permettant de reconnaître environ 47400 transcrits différents, soit 38500 gènes. Les sondes sont situées en majorité sur la partie 3'NT des transcrits.

II. Méthodes

A. Préparation des extraits cellulaires et tissulaires

1. Préparation des extraits cellulaires

a) Extraction totale

Les extraits nucléaires ont été préparés directement par ajout du tampon de lyse RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) (Sigma R-0278), additionné de 2,4% (v/v) de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma P8340), sur les cellules adhérentes préalablement lavées avec du PBS. La suspension a été incubée 5 min dans la glace et centrifugée 10 min à 8000g. Le surnageant a été prélevé et ensuite aliquoté puis conservé à -80°C .

b) Extraction cytoplasmique

Toutes les étapes ont été réalisées à 4°C . Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (tampon phosphate salin) et décollées du support par un grattage mécanique en présence de PBS. Puis les cellules ont été centrifugées à 400g pendant 5min. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été vortexées doucement. Pendant le vortexage, le tampon de lyse a été ajouté (10mM Hepes pH 7,6, 40mM KCl, 3mM MgCl_2 , 2mM dithiothréitol (DTT), 5% (v/v) glycérol, 0,5% (v/v) NP40, 5mM orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), 10mM fluorure de sodium (NaF), 2,4% (v/v) cocktail inhibiteurs de protéases Sigma P8340). La suspension a été

incubée 5 min dans la glace et centrifugée 5min à 900g. Le surnageant a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C .

c) Extraction nucléaire

Les noyaux ont été récupérés après la dernière étape de centrifugation lors de l'extraction cytoplasmique. Les noyaux ont été lavés 2 fois avec le tampon de lyse cytoplasmique (les noyaux ont été culotés à 1600g à 4°C 5 minutes entre les deux lavages). Le surnageant a été éliminé et les noyaux ont été vortexés doucement. Pendant le vortexage, le tampon de lyse nucléaire a été ajouté (10mM Hepes (pH 7,6), 0,1mM EGTA (pH 8,0), 0,1mM EDTA (pH 8,0), 1,5mM MgCl_2 , 420mM NaCl, 0,5mM dithiothréitol (DTT), 25% (v/v) glycérol, 5mM orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), 10mM fluorure de sodium (NaF), 2,4% (v/v) cocktail inhibiteurs de protéases Sigma P8340). La suspension a été incubée 20 min dans la glace et centrifugée à 4°C 5min à 2000g. Le surnageant a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C .

2. Préparation des extraits tissulaires

L'extraction des protéines à partir des tissus hépatiques humains a été réalisée par broyage mécanique des tissus en présence du tampon de lyse RIPA additionné de 1mM d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), 4,7mM de fluorure de sodium (NaF) et 1% (v/v) de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma P8340). Un fragment de tissu d'environ 30 à 60 mg a été placé dans un tube de 2mL (Safelock) en présence de 2 billes de tungstène (Qiagen Tungsten carbide beads) puis 10 μL de tampon par mg de tissu ont été ajoutés. Le tube est agité à l'aide d'un broyeur vibrant par périodes de 1min à 30Hz jusqu'à homogénéisation du tissu. Le mélange a été centrifugé à 8000g pendant 15 minutes à 4°C . Le surnageant a été récupéré, aliquoté et stocké à -80°C .

B. ARN interférence

Les expériences de transfection des cellules HuH7 par les siARN HuR et les siARN contrôle LUC ont été réalisées selon le protocole de transfection « Lipofectamine RNAiMAX » d'Invitrogen, qui consiste en une première transfection sur les cellules en suspension appelée Reverse Transfection et une deuxième transfection, 24 heures plus tard, sur ces mêmes cellules une fois adhérentes, appelée Forward Transfection. Dans un premier temps, 480pmol de siARN et 20µL de lipofectamine RNAiMAX ont été dilués dans 2mL de milieu Opti-MEM et incubés 10 minutes à température ambiante. La solution a ensuite été mélangée à 10^6 cellules dans une boîte de Pétri 100x20mm. Les cellules ont été cultivées à 37°C, avec une teneur en CO₂ de 5%, dans un milieu DMEM à 4,5g/L de glucose contenant 10% de sérum de veau fœtal sans antibiotiques. Au bout de 24 heures le milieu DMEM a été renouvelé et une nouvelle solution de siARN (même conditions que précédemment) a été ajoutée. Les cellules ont été cultivées puis récupérées pour les analyses 4 jours après la première transfection.

C. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux a été réalisée de 3 façons différentes :

Les ARN totaux, issus des cellules HuH7 traitées avec les siARNs HuR et LUC, destinés à être analysés sur puces à ADN, ont été isolés à partir d'environ 10^7 cellules à l'aide du kit « Total RNA isolation, Nucleospin RNA II » (Macherey-Nagel) et leur concentration finale a été déterminée par mesure de la densité optique à 260nm. Pour vérifier la pureté de l'ARN, un spectre d'absorbance de 220nm à

320nm a été effectué et le rapport de densité optique 260/280 calculé. Pour contrôler qu'il n'y a pas eu de dégradation des ARN, ceux-ci ont été analysés sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v).

Les ARN totaux issus des expériences d'immunoprécipitation de la protéine HuR ont été isolés à l'aide du kit « RNAqueous-Micro Kit » (Ambion) et leur concentration finale a été déterminée par mesure de la densité optique à 260nm (Nanodrop).

L'extraction des ARN totaux à partir des tissus hépatiques humains a été réalisée par extraction au phénol-chloroforme à l'aide du « TRIzol Reagent » d'Invitrogen. Ce réactif contient un mélange de guanidine thiocyanate et de phénol. Un fragment de tissu d'environ 30 à 60 mg a été placé dans un tube 2mL (Safelock) en présence de 2 billes de Tungsten (Qiagen Tungsten carbide beads) et de 1mL de TRIzol. Le tube a été agité à l'aide d'un broyeur vibrant par période de 1min à 30Hz jusqu'à homogénéisation du tissu. 200µL de chloroforme ont été ajoutés, puis le mélange a été centrifugé à 8000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et 200µL de chloroforme ont été ajoutés puis vortexés 15 secondes. Après 10 minutes de repos à température ambiante, le mélange a été centrifugé à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. Le mélange se sépare en 3 phases : une phase organique contenant les protéines, une interphase contenant l'ADN et une phase aqueuse contenant les ARN. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube puis 500µL d'isopropanol ont été ajoutés pour précipiter les ARN. Le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec 500µL d'éthanol 75%, puis centrifugé à 7500g pendant 5 minutes à 4°C. Les ARN ont été repris dans 50µL d'eau DEPC et conservé à -80°C. Pour vérifier la pureté de l'ARN le rapport de densité optique 260/280 a été calculé. Pour contrôler qu'il n'y a pas eu de dégradation des ARN ceux-ci ont été analysés sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v).

D. RT-PCR quantitative

1. Transcription inverse

Dans un premier temps, 1µg d'ARN, 0,5µg oligo(dT) et 0,5µg d'un mélange aléatoire d'hexanucléotides ont été dénaturés à 70°C pendant 5 minutes et immédiatement refroidis dans la glace pendant 5 minutes. Le tampon de réaction a ensuite été ajouté (50mM Tris et 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, pH 8,3), ainsi que des dNTPs à 1mM final chacun, 40 unités de RNase Inhibitor et 30 unités de Reverse Transcriptase AMV (Promega). Le mélange a été incubé 10 minutes à 25°C pour permettre l'hybridation des hexanucléotides et des oligo(dT) avec les ARN, puis la synthèse d'ADNc a été réalisée pendant 1 heure à 42°C. Enfin l'enzyme a été inactivée à 85°C pendant 5 secondes.

La transcription inverse des ARN issus de l'immunoprécipitation a été réalisée avec le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems).

2. *PCR quantitative*

Les quantités d'ARNm ont été déterminées après transcription inverse par PCR quantitative (qRT-PCR). L'ADNc de la GAPDH (dans le cas des immunoprécipitations) et de l'ARNr 18S ont été utilisés comme contrôle endogène. La réaction a été effectuée dans un volume total de 20µL avec 2µL d'une dilution au 1/5^{ème} de la réaction de RT ou 2 µL d'eau pour le témoin négatif, 0,2 µM d'amorces sens et antisens et 10µL du MasterMix 2X du kit « B-R SYBR Green SuperMix for iQTM » de *Quanta Biosciences* qui contient la Hotstart *Taq* polymerase, le magnésium, les dNTP et le SyBR Green. Trois répliques ont été réalisés par échantillon. La PCRq a été effectuée avec le thermocycleur « StepOne Plus Real-Time PCR System » de *Applied Biosystems*. Le programme utilisé était composé d'une étape d'activation de l'enzyme 5 minutes à 95°C, suivie de 35 cycles d'une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et d'une étape d'hybridation et d'élongation des amorces 20 secondes à 60°C. Ensuite, le programme s'est terminé en chauffant les échantillons à 95°C et en diminuant progressivement la température jusqu'à 60°C pour établir la courbe de fusion.

E. Western-blot

1. Dosage protéique

Le dosage des protéines a été effectué avec le kit « Bio-Rad Protein Assay » basé sur la méthode Bradford. Après coloration des protéines, la DO a été lue à 595nm et rapportée à une gamme étalon de BSA afin de déterminer la concentration de protéines.

2. Préparation des échantillons

Avant d'être déposés sur gel, les échantillons protéiques ont été dénaturés 5 minutes à 100°C dans un tampon Laemmli contenant 10 0mM de DTT, 2% de SDS, 8% de glycérol et du bleu de bromophénol.

3. Séparation des protéines

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou SDS-PAGE. Sa composition était la suivante : un mélange (29 :1) d'acrylamide/bis-acrylamide 10%, SDS 0,1%, Tris-HCl pH 8,8 375mM. La polymérisation a été initiée en ajoutant 0,2mL d'APS 10% (w/v) et 26µL de TEMED pour 40mL de gel. Le tampon d'électrophorèse se composait de Tris base 25mM, de glycine 192mM et de SDS 0,1%.

4. *Western-blot et immunodétection*

Après électrophorèse, les protéines ont été soumises à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose (Whatman Protran) en condition liquide (tampon Tris 89mM, acide borique 89mM et EDTA 2mM) pendant au moins 45 minutes à 4°C. La membrane a ensuite été lavée au PBS puis bloquée au moins une heure avec le tampon de blocage Li-Cor Odyssey. Les anticorps primaires et secondaires couplés à un fluorophore permettant la révélation, ont été incubés avec la membrane au moins une heure dans le tampon de blocage Li-Cor Odyssey. Les signaux de fluorescence ont ensuite été détectés et quantifiés avec l'appareil de lecture infrarouge Odyssey.

5. *Coloration au Sypro Ruby*

La coloration de la membrane de nitrocellulose au Sypro Ruby permet de colorer l'ensemble des protéines présentes sur la membrane de façon quantitative et avec une sensibilité équivalente à la coloration au nitrate d'argent (de l'ordre de 0,1ng). La coloration a débuté par une étape de fixation des protéines sur la membrane de nitrocellulose dans une solution d'acide acétique 7% et de méthanol 10% pendant 15 minutes. La membrane a ensuite été rincée 4 fois pendant 5 minutes à l'eau distillée puis immergée dans la solution de coloration « SYPRO Ruby protein blot stain » (Biorad) pendant 15 minutes. La membrane a été à nouveau rincée 4 à 6 fois pendant 1 minute à l'eau distillée, puis la coloration a été révélée et quantifiée à l'aide du scanner à fluorescence Pharos de Biorad.

F. *Marquage immunohistochimique*

Des sections de 3µm de tissus préalablement fixés en formaline et inclus en paraffine ont été utilisées. Les tissus ont été déparaffinés dans 2 bains de toluène de 5 minutes puis réhydratés dans des bains successifs d'alcool (100%, 100% et 95%) et finalement dans un bain d'eau. Chaque étape a été réalisée pendant 1 minute. Les sites antigéniques ont ensuite été démasqués à 98°C dans un tampon citrate (0,01M) pH 6,0 pendant 40 minutes et les peroxydases endogènes ont été inhibées avec de l'H₂O₂ à 3%. Après saturation des sites aspécifiques avec une solution de blocage « Serum-free Protein block » (Dako), les lames ont été incubées avec l'anticorps anti-HuR monoclonal de souris à une dilution de 1/250^{ème} pendant 45 minutes puis lavées en TBS-Tween 0,1%. L'anticorps secondaire « Envision mouse » a ensuite été appliqué pendant 30 minutes et après rinçage au TBS-Tween 0,1% une solution de DAB+ (Dako) a été ajoutée pour la révélation. Les tissus ont ensuite été contre-colorés à l'Hémalun, déshydratés par des bains successifs d'alcool (95%, 100% et 100%) et de toluène (2 bains de 5 minutes) puis les lames ont été montées à l'Eukitt (Labonord).

G. Immunoprécipitation de la protéine HuR

1. Préparation des billes de sépharose protéine G

Les billes de sépharose protéine G (Sigma P3296) ont été préalablement lavées deux fois avec 1 mL de tampon NT2. Ce tampon contient du Tris pH 7,5 (50 mM), du NaCl (150 mM), du MgCl₂ (1 mM) et du NP40 (0,05%). Environ 90µL de billes par condition ont été incubées sous agitation 2 heures à 4°C, avec 120µg d'anticorps (4µg d'anticorps pour 100µg de protéines) dans un volume final de 600µL de NT2. Les billes ont ensuite été saturées avec 5% (v/v) de BSA 2 heures à 4°C puis rincées par 5 lavages de 500µL de NT2.

2. Immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques

L'immunoprécipitation a été réalisée avec 3mg d'extraits protéiques cytoplasmiques (environ 2×10^8 cellules). Les extraits ont été dilués dans un volume final de 910 μ L de tampon de réaction composé de 200u de « RNasin Plus RNase Inhibitor » (Promega), 1% (v/v) de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma P8340), 1mM de DTT, 15mM d'EDTA et complété avec du tampon NT2. Une étape de « pré-clearing » a été effectuée avant l'immunoprécipitation. Pour cela, le mélange a été incubé avec 90 μ L de billes couplées à l'anticorps IgG contrôle pendant 2 heures à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis incubé avec 90 μ L de billes couplées à l'anticorps anti-HuR (ou IgG dans le cas de la fraction contrôle) sur la nuit à 4°C. Les billes ont été récupérées et rincées avec un premier lavage de 1mL de tampon NT2, suivi de 5 lavages avec du tampon NT2 additionné de 1M d'Urée et 2 derniers lavages en NT2. Chaque lavage a été réalisé sur une durée de 5 minutes. Une fraction des billes (environ 1/20^{ème}) a été récupérée pour analyser la spécificité de purification de la protéine HuR par western-blot et le reste des billes a été utilisé pour réaliser l'extraction des ARN.

H. Puces à ADN Affymetrix

Les analyses sur puces Affymetrix ainsi que la normalisation des données ont été effectuées par la Plateforme Biopuces et Séquençage IGBMC à Illkirch.

I. Analyses bioinformatiques

1. Analyse statistique des données transcriptomiques

Une fois les données transcriptomiques normalisées par la méthode RMA (Robust Multi-Array), l'analyse des gènes différentiellement exprimés a été réalisée à l'aide du logiciel SAM (Significance Analysis of Microarrays). Seuls les gènes enrichis d'au moins un facteur 3 dans les expériences de RIP-Chip ou les gènes présentant une variation d'expression d'un facteur 2 dans les expériences de siARNs ont été sélectionnés.

Les données transcriptomiques issues des expériences siHuR ont également été analysées avec le logiciel LIMMA (Linear Models for Microarray Data) associé au logiciel statistique R/Bioconductor, en collaboration avec le Dr Audrey Kauffmann.

2. Analyse ontologique

La classification des gènes par leur fonction moléculaire (MF), par les processus biologiques (BP) et les voies de signalisations dans lesquels ils sont impliqués a été réalisée à l'aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Les banques de données PANTHER_BP_ALL et PANTHER_MF_ALL ont été utilisées pour l'identification des fonctions moléculaires et des processus biologiques et la banque de données KEGG_PATHWAY a été utilisée pour l'identification des voies de signalisation cellulaire. Ces analyses ont été faites avec les paramètres par défaut du logiciel, c'est-à-dire une $p\text{-value} \leq 0,1$ et un minimum d'au moins 2 gènes pour qu'une catégorie soit considérée comme significative.

3. *Analyses statistiques*

Le test non paramétrique Wilcoxon a été utilisé pour les comparaisons d'expressions (ARNm et protéine) dans les tissus. L'analyse des corrélations a été effectuée avec le test non paramétrique de Spearman. Pour finir, les comparaisons statistiques de plusieurs moyennes ont été réalisées à l'aide du test ANOVA Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunnett. Les valeurs $p \leq 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives. Tous ces tests ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0.

RÉSULTATS 1

Dans l'objectif d'étudier les mécanismes de régulation post-transcriptionnel dans le CHC, mon travail de thèse s'est articulé autour de deux stratégies (**Figure 57**). La première stratégie utilisée consistait à s'intéresser à un ARNm dérégulé dans le CHC afin d'identifier les ARE-BPs potentiellement impliquées dans cette dérégulation. La seconde stratégie consistait à s'intéresser à deux ARE-BPs, la protéine HuR et la protéine AUF1, présentant une augmentation de leurs niveaux protéiques dans le CHC (voir chapitre suivant), et ainsi identifier les conséquences de cette surexpression sur des ARNm régulés par ces protéines. Dans cette deuxième stratégie, deux approches ont été effectuées en parallèles. Une première approche, ciblée, afin d'étudier la régulation de l'ARNm du glypican 3 (GPC3) par la protéine AUF1, et une deuxième approche, globale, afin d'étudier le rôle de la protéine HuR dans le CHC en identifiant de façon globale les ARNm régulés par cette protéine.

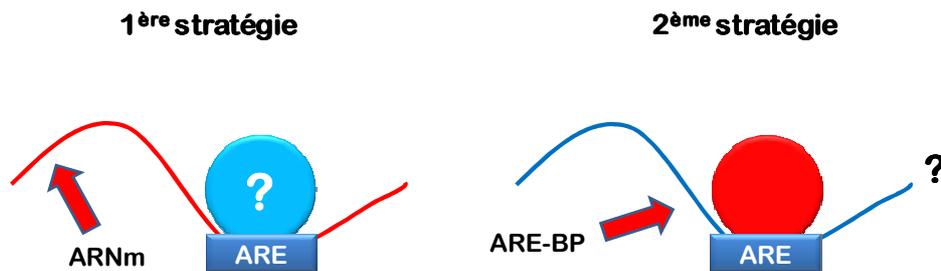


Figure 57 : Stratégies utilisées pour l'étude de la régulation post-transcriptionnelle dans le CHC

Avant de vous présenter la thématique principale de mon sujet de thèse portant sur l'étude du rôle de la protéine HuR dans le CHC, je vous présenterai la première stratégie entreprise lors de ma première année de thèse qui a consisté dans la mise au point d'une technique de purification d'un ARNm avec ses protéines associées *in vivo*. Je vous présenterai ensuite les résultats préliminaires de la deuxième stratégie concernant la régulation de l'ARNm du GPC3 par la protéine AUF1.

I. Première stratégie

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les mécanismes de régulation de l'expression génique associés aux éléments AREs dépendent des facteurs *trans* protéiques, les ARE-BPs, qui s'y associent. Celles-ci en interagissant avec des facteurs impliqués dans la dégradation ou dans la traduction des ARNm auront la capacité de réguler de façon positive ou de façon négative ces mécanismes. De plus, des ARE-BPs ayant des rôles opposés, comme par exemple la protéine HuR, principalement décrite comme stabilisant les ARNm, et la protéine AUF1 principalement décrite comme déstabilisant les ARNm, sont capables de se fixer sur la même séquence ARE de façon compétitive, mais également de façon synergique pour former des complexes régulateurs (David, Tanveer et al. 2007). C'est pourquoi, afin de mieux comprendre ce type de régulation, il est important de connaître la nature du complexe protéique associé à l'ARE d'un ARNm.

L'objectif consistait donc à isoler à partir d'un extrait cytoplasmique une séquence ARNm contenant un ARE, afin de caractériser l'ensemble des ARE-BPs associées *in vivo*. Ainsi par comparaison entre une situation pathologique et une situation normale, les protéines responsables d'une modification du taux d'un ARNm d'intérêt pourront être identifiées.

Pour réaliser ce travail notre stratégie a été d'étiqueter un ARNm, c'est-à-dire d'introduire une séquence ARN, un aptamère, pour purifier cet ARNm (**Figure 58**).

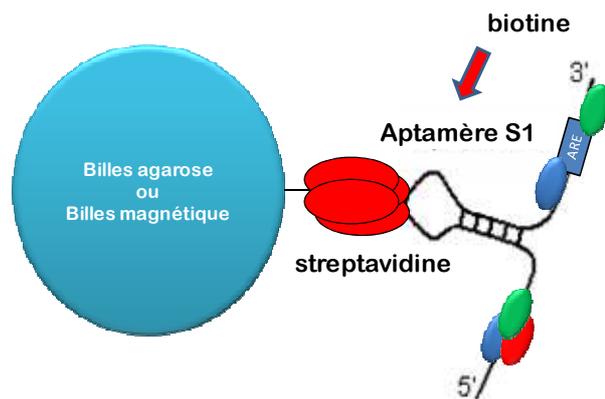


Figure 58 : Représentation schématique de la purification d'un ARNm en utilisant le système d'interaction aptamère S1/streptavidine.

Cette technique repose sur l'utilisation de l'aptamère S1 isolé d'une librairie de 10^{16} séquences d'ARN aléatoires par la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) pour son affinité à la streptavidine (Srisawat and Engelke 2001). L'ARNm étiqueté est purifié via l'aptamère S1 qui se fixe à la streptavidine présente à la surface de billes d'agarose, avec une constante de dissociation de 70nM. L'ARNm est ensuite élué spécifiquement par l'ajout de biotine possédant une meilleure affinité pour la streptavidine avec une constante de dissociation de 10^{-14} M. Les protéines associées à notre ARNm d'intérêt sont séparées sur un gel d'électrophorèse monodimensionnel, et après coloration, sont identifiées par spectrométrie de masse.

Afin de réaliser un suivi de la spécificité de purification, la présence ou non de l'ARNm étiqueté et d'un ARNm endogène contrôle (sans étiquette) codant pour la protéine ribosomale P0 (RPLP0) a été recherchée à différentes étapes de la purification par RT-PCR semi-quantitative (*Figure 59*).

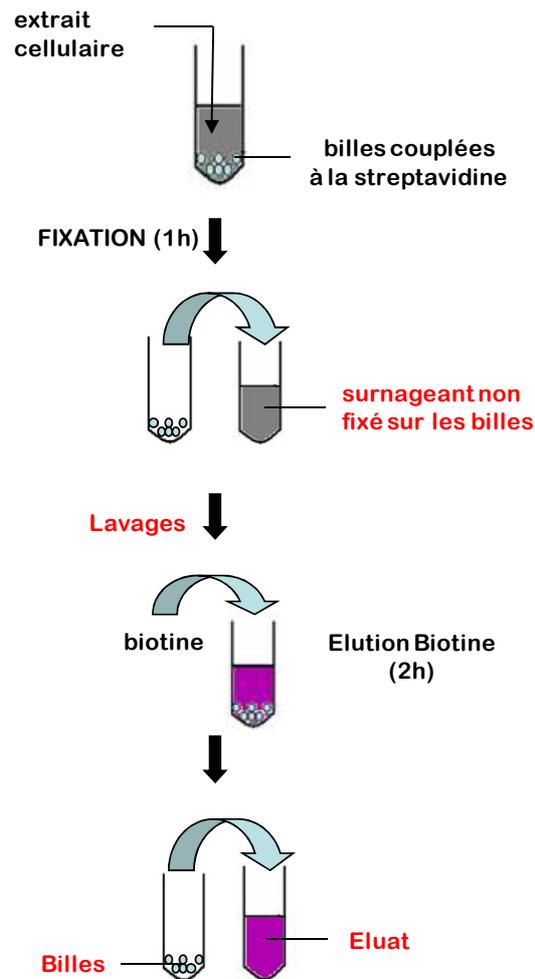


Figure 59 : Protocole de purification des ARNm étiquetés avec l'aptamère S1. Les éléments marqués en rouge correspondent aux fractions récupérées durant la purification afin de réaliser un suivi de la spécificité par RT-PCR semi-quantitative.

Ce suivi de spécificité a permis de mettre en évidence trois problèmes majeurs durant la purification. Le premier, concerne le faible rendement de purification de notre ARNm d'intérêt. Comme nous pouvons le voir sur la figure 4, pour les 5 types de billes testés, le rendement est compris entre 1% et 4,5% de l'ARNm d'intérêt présent au début de la purification. Le deuxième problème concerne le manque de reproductibilité entre les expériences. Pour un même type de billes, par exemple les Ademtech 300nm, l'expérience a été réalisée 3 fois et les pourcentages d'ARNm spécifiques élués sont très variables : 1,8%, 2,2% et 4,5%. Pour finir, dans la fraction de l'éluat, ne devant contenir que l'ARNm étiqueté, de l'ARNm non spécifique est également retrouvé. Effectivement la présence de l'ARNm codant pour la protéine

ribosomale P0 a été analysée dans les différentes fractions et comme nous pouvons le voir sur la figure 4, jusqu'à 11% de cet ARNm peut être retrouvé dans l'élution.

	Invitrogen™												Ademtech							
	Agarose				MyOne				M280				200nm				300nm			
	NF	L	E	B	NF	L	E	B	NF	L	E	B	NF	L	E	B	NF	L	E	B
spécifique	98,5	0,1	1,2	0,2	95,5	ND	3	1,5	97,9	ND	1	1,1	98,1	ND	1,8	0,04	95,2	ND	4,5	0,26
aspécifique	91,7	ND	8,1	0,2	85,6	0,6	11,1	2,6	98,7	ND	0,08	1,2	99,9	ND	ND	0,1

	Invitrogen™												Ademtech							
	Agarose				MyOne				M280				200nm				300nm			
	NF	L	E	B	NF	L	E	B	NF	L	E	B	NF	L	E	B	NF	L	E	B
spécifique	98,7	ND	1,06	0,24	97,5	0,1	2,4	ND	98,7	0,1	1,2	ND	97,7	ND	1,9	0,4	97,7	ND	1,8	0,5
aspécifique	96,7	0,3	1,8	1,2	97,5	0,5	2	ND	98,7	0,2	1,1	ND	96,5	0,3	2,9	0,3	96,8	0,2	2,7	0,3

	Invitrogen™				Ademtech			
	MyOne				300nm			
	NF	L	E	B	NF	L	E	B
spécifique	96,9	ND	2,8	0,3	97,8	ND	2,2	ND
aspécifique	94,8	ND	5,1	0,1	98,8	ND	1,2	ND

Figure 60 : Bilan des quantifications après le suivi de la spécificité par RT-PCR semi-quantitative sur la fraction non fixée (NF), la fraction correspondant au dernier lavage des billes (L), la fraction d'élution (E) et les billes après élution (B). Les résultats sont indiqués en pourcentages et la mesure a été effectuée sur l'ARNm étiqueté (spécifique) et un ARNm contrôle (aspécifique). L'expérience a été réalisée avec 5 types de billes différentes : 4 de types magnétiques (Invitrogen MyOne et M280, Ademtech 200 et 300nm) et 1 de type agarose et répétée au moins 2 fois. Les échantillons qui n'ont pu être quantifiés sont indiqués comme « non déterminés » (ND).

Afin de palier à ces différents problèmes, plusieurs paramètres du protocole de purification ont été modifiés. Dans un premier temps d'autres types de billes couplées à la streptavidine ont été utilisés, des billes magnétiques, afin de faciliter les lavages et ainsi diminuer plus efficacement les fixations aspécifiques. Dans un deuxième temps, les différents tampons utilisés ont été modifiés. La stringence des tampons de lavages des billes a été testée en modifiant la concentration en sel, différentes concentrations de biotine ont également été testées dans le tampon d'élution et l'ajout d'EDTA (connu pour faciliter la libération des ARNm dans la fraction polysomale) a été testé dans le tampon d'extraction des protéines cytoplasmiques cellulaires. Enfin des modifications de l'étiquette S1 ont été testées au niveau de sa séquence, notamment par l'utilisation d'une étiquette S1 plus courte, et de sa structure secondaire par chauffage à différentes températures.

Tous ces tests n'ayant pas donné de résultats encourageants et voyant que cette technique prendrait du temps à mettre au point, nous avons décidé de passer à une deuxième stratégie en s'intéressant non pas aux ARNm, mais aux ARE-BPs.

II. Deuxième stratégie

A. Analyse du taux de protéine HuR, TIA1 et AUF1 dans le CHC

Nous avons analysé le taux de 3 ARE-BPs, dans des tissus hépatiques humains en comparant le tissu tumoral avec le tissu péri-tumoral correspondant. Cette analyse a été réalisée de façon quantitative par western-blot sur des extraits protéiques réalisés à partir des tissus (*Figure 61*), et de façon qualitative par marquage immunohistochimique sur des coupes histologiques.

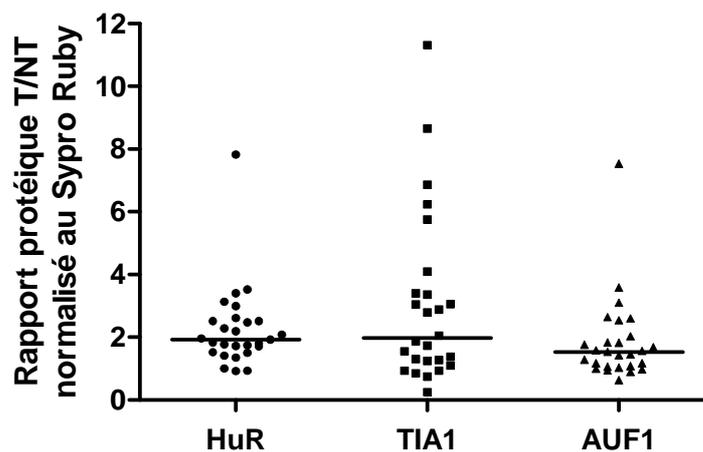


Figure 61 : Analyse quantitative du taux de protéine HuR, TIA1 et AUF1 par western-blot sur des extraits protéiques tumoraux (T) et non tumoraux (NT) de 27 patients atteints de CHC. Chaque point représente le rapport T/NT pour un patient.

HuR, TIA1 et AUF1 présentent un taux protéique plus important dans le tissu tumoral hépatique par rapport au tissu non tumoral (également confirmé par les marquages immunohistologiques). Ces 3 ARE-BPs présentent des médianes de surexpression de 1,9, 2,0 et 1,5 fois respectivement pour HuR, TIA1 et AUF1.

Pour la suite de cette étude nous avons donc choisi de travailler de façon ciblée sur la protéine AUF1 et l'effet de sa surexpression sur la régulation de l'ARNm du glypican3 dans le CHC (ces résultats préliminaires seront présentés dans la suite de cette partie). En parallèle, nous avons décidé de nous intéresser à la protéine HuR par une approche plus globale, afin de mettre en évidence l'effet d'une augmentation du niveau protéique d'HuR dans le CHC, en identifiant l'ensemble des ARNm régulés par cette protéine dans le CHC (cette étude fera l'objet d'une partie plus détaillée dans la suite de mon manuscrit).

B. La protéine AUF1 et le glypican3 (GPC3)

Le Glypican-3 (GPC3) est une protéine de la famille des héparanes sulfate protéoglycanes qui est fixée à la membrane externe des cellules par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Le GPC3 est un co-récepteur impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la transduction du signal induit par certains facteurs tels que BMP7 ou FGF2 (Midorikawa, Ishikawa et al. 2003; Akutsu, Yamamoto et al. 2010). Il est surexprimé dans 72% carcinomes hépatocellulaires (CHC) et utilisé comme marqueur immunohistologique et sérologique dans le cancer du foie. L'association du GPC3 et de l' α -foetoprotéine (AFP) en fait un outil de diagnostic efficace avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 76 à 84% (Capurro, Wanless et al. 2003). Dans la carcinogenèse hépatique, le GPC3 semble de plus jouer un rôle pro-oncogénique majeur via en particulier la voie Wnt/ β -Caténine (Zittermann, Capurro et al. 2010).

L'origine moléculaire de la surexpression du GPC3 dans le CHC est mal connue. Des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe nous ont permis de montrer

que l'ARNm du GPC3 pouvait être soumis à des régulations post-transcriptionnelles dans le CHC et que la protéine AUF1 pouvait être impliquée dans ce mécanisme.

La protéine AUF1 possède quatre isoformes $p37^{AUF1}$, $p40^{AUF1}$, $p42^{AUF1}$ et $p45^{AUF1}$ qui sont issues d'un épissage alternatif. L'extinction préférentielle de certaines isoformes d'AUF1 est réalisée en utilisant des siRNA spécifiques de certaines séquences exoniques d'AUF1. Les siEX1, siEX2 et siEX7, spécifiques des exons 1, exons 2 et exons 7, conduisent respectivement à une diminution de toutes les isoformes, des isoformes $p40^{AUF1}$ et $p45^{AUF1}$, et des isoformes $p42^{AUF1}$ et $p45^{AUF1}$ (**Figure 61**).

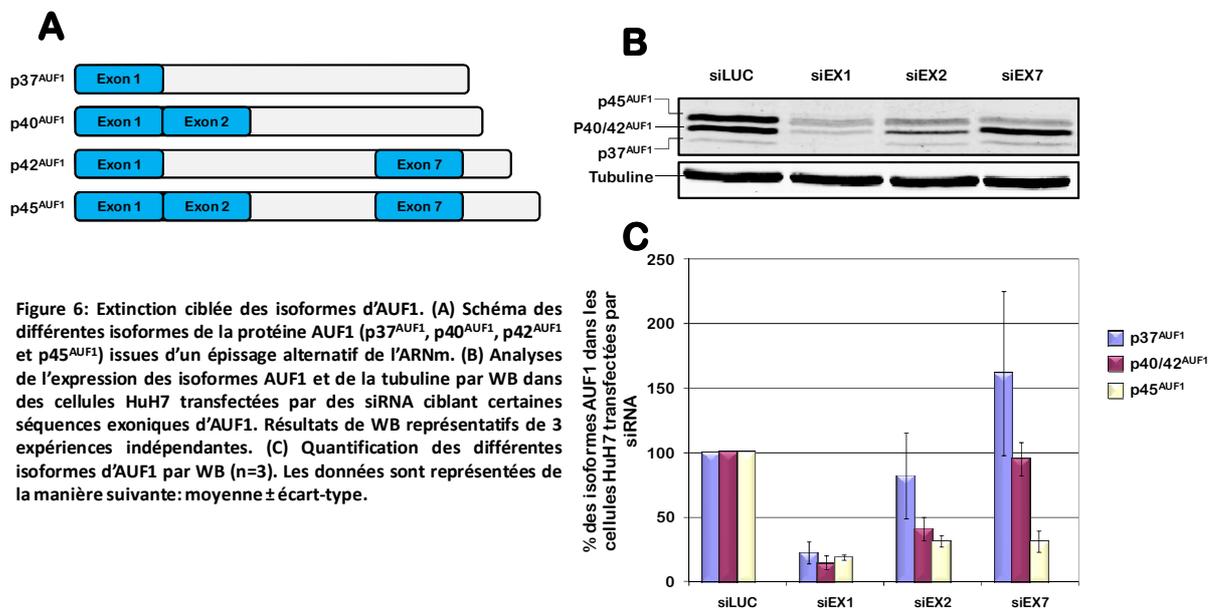


Figure 6: Extinction ciblée des isoformes d'AUF1. (A) Schéma des différentes isoformes de la protéine AUF1 ($p37^{AUF1}$, $p40^{AUF1}$, $p42^{AUF1}$ et $p45^{AUF1}$) issues d'un épissage alternatif de l'ARNm. (B) Analyses de l'expression des isoformes AUF1 et de la tubuline par WB dans des cellules HuH7 transfectées par des siRNA ciblant certaines séquences exoniques d'AUF1. Résultats de WB représentatifs de 3 expériences indépendantes. (C) Quantification des différentes isoformes d'AUF1 par WB (n=3). Les données sont représentées de la manière suivante: moyenne \pm écart-type.

L'extinction ciblée des isoformes d'AUF1 donne des résultats différents en termes d'expression du GPC3 (**Figure 61**). Une diminution d'expression (ARNm et protéine) du GPC3, d'environ 40%, est observée après l'extinction des isoformes $p40^{AUF1}$ et $p45^{AUF1}$ (siEX2) alors que l'extinction des isoformes $p42^{AUF1}$ et $p45^{AUF1}$ (siEX7) n'a pas d'effet. Ce résultat suggère que l'isoforme $p40^{AUF1}$ pourrait jouer un rôle positif dans le contrôle de l'expression du GPC3. Cependant une extinction de la totalité des isoformes n'entraîne pas de variation d'expression du GPC3, suggérant un effet

compensatoire entre les différentes isoformes, phénomène déjà décrit dans la littérature (Raineri, Wegmueller et al. 2004).

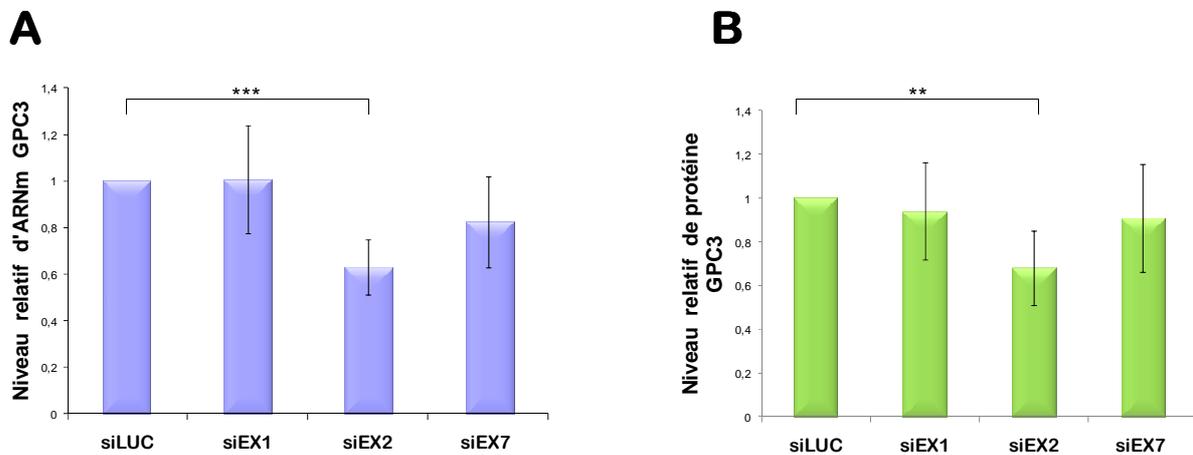


Figure 7 : Analyse de l'expression du GPC3 après extinction ciblée des isoformes d'AUF1. (A) Résumé de trois analyses par qRT-PCR sur ARN isolés dans les cellules HuH7 transfectées transitoirement par siRNA. Les données (moyenne \pm écart-type) représentent le niveau relatif d'ARNm du GPC3. (B) Analyse du niveau relatif protéique du GPC3 dans les cellules HuH7 transfectées transitoirement par siRNA. Les données (moyenne \pm écart-type) proviennent d'une quantification normalisée du taux de protéines par WB sur des extraits protéiques cellulaires totaux (n=3).

La protéine AUF1 étant une protéine capable de se lier à l'ARN, nous avons cherché à savoir si elle était capable d'interagir avec l'ARNm du GPC3 *in vivo*. Pour cela, la protéine AUF1 a été immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules HuH7 puis la détection de l'ARNm du GPC3 est effectuée par qRT-PCR (**Figure 61**). Aucune interaction entre AUF1 et l'ARNm du GPC3 n'est retrouvée que ce soit dans les extraits cellulaires préparés avec un détergent ionique ou zwitterionique. Ces résultats suggèrent: (i) soit que nos conditions d'analyses actuelles ne permettent pas la détection d'une association entre l'ARNm du GPC3 et AUF1, (ii) soit que l'effet positif de p40^{AUF1} sur l'expression du GPC3 pourrait être due à une régulation transcriptionnelle, ce qui a déjà été décrit en ce qui concerne la protéine AUF1 (Tolnay, Lambris et al. 1997; Dobi, Szemes et al. 2006).

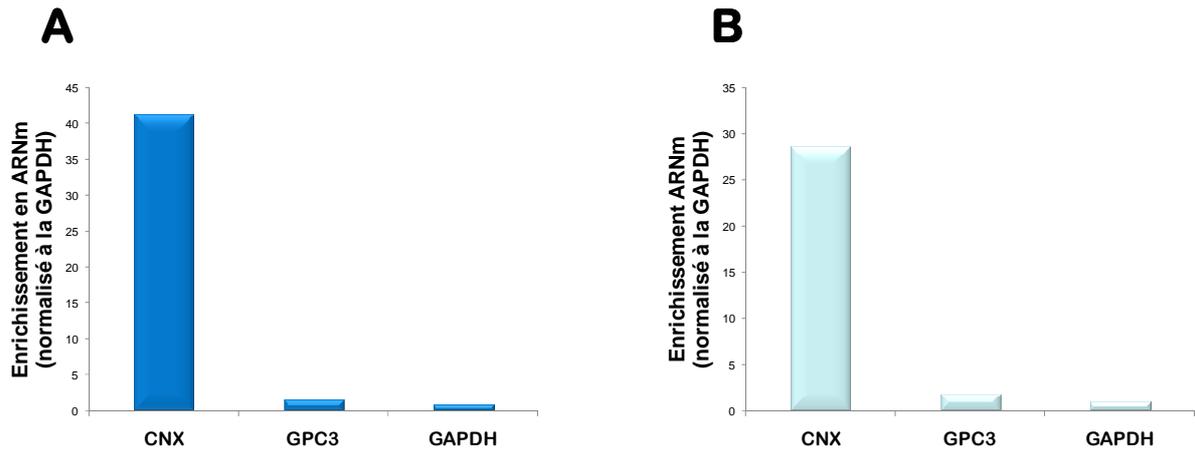


Figure 8 : Recherche d'une interaction entre l'ARNm du GPC3 et la protéine AUF1 dans les cellules HuH7. (A) Analyse de la fixation de l'ARNm du GPC3 par AUF1 après co-IP de la protéine et qRT-PCR ciblée à partir d'extraits cellulaires totaux préparés à l'aide d'un tampon contenant plusieurs détergents ioniques (RIPA). (B) Même expérience que (A) mais avec des extraits cellulaires préparés avec un détergent zwitterionique (CHAPS). Ici l'ARNm de la Calnexine (CNX) et de la GAPDH servent respectivement de contrôles positif et négatif pour l'association de AUF1 avec ses ARNm cibles *in vivo*.

Afin de confirmer cette hypothèse, les perspectives de ce travail seront de mesurer l'activité transcriptionnelle du promoteur du GPC3 à l'aide d'un système gène rapporteur dans des cellules HuH7 où l'expression de chaque isoforme d'AUF1 sera modulée à la hausse ou à la baisse par respectivement expression ectopique ou ARN interférence. Les résultats de ces expériences devraient nous aider à déterminer si la régulation du GPC3 par AUF1 est transcriptionnelle et dépend de l'isoforme p40^{AUF1}.

RÉSULTATS 2

I. Analyse de l'expression de la protéine HuR dans le CHC

A. Mise au point de la quantification d'HuR

L'objectif était de pouvoir quantifier et comparer par western-blot le niveau protéique d'HuR dans des extraits protéiques de tissus hépatiques tumoraux et péri-tumoraux humains. Connaissant la grande variabilité qu'il peut y avoir en terme d'expression protéique entre un tissu pathologique et un tissu sain ou même d'un patient à un autre, il aurait été inapproprié de n'utiliser qu'une seule protéine de référence (exemple : GAPDH, tubuline, actine). Nous avons donc décidé de normaliser notre signal « HuR » à la quantité totale de protéines présentes sur la membrane. Pour cela, avant l'immunodétection d'HuR, la coloration de la membrane au Sypro Ruby a été utilisée. Il était donc nécessaire de vérifier que cette coloration d'une part soit quantitative et d'autre part n'empêche pas l'immunodétection et donc la quantification des protéines.

Un même extrait protéique a été déposé sur gel à des quantités différentes puis la membrane a été colorée ou non au Sypro Ruby. Les protéines GAPDH et calnexine ont ensuite été immunodéteectées et quantifiées (***Figure 1***).

La détection de la coloration a été effectuée sous UV, et la quantification réalisée par le logiciel ImageJ.

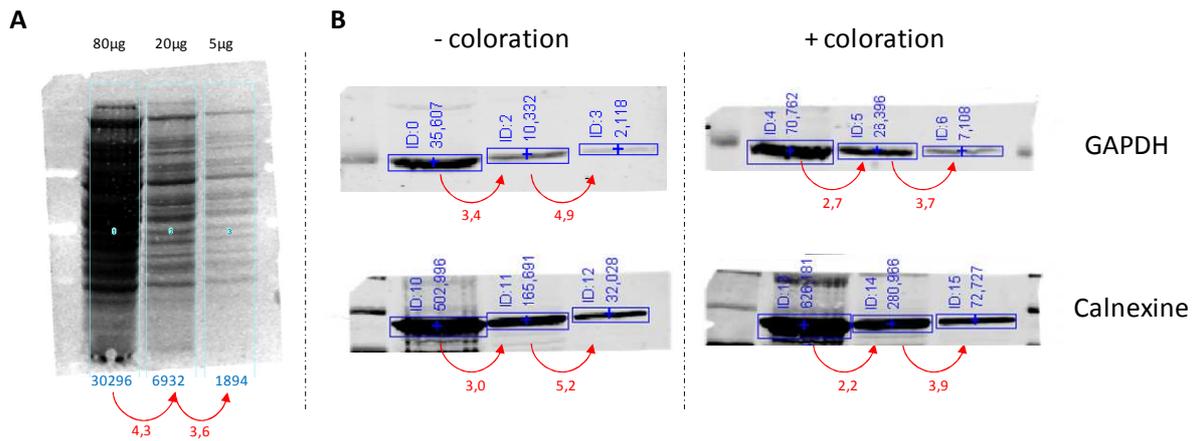


Figure 62 : Vérification de l'aspect quantitatif de la coloration au Sypro Ruby. A : coloration et quantification des protéines totales présentes sur la membrane provenant d'un même extrait tissulaire de foie humain. B : immunodétection et quantification de la GAPDH et de la calnexine.

Comme nous pouvons le voir sur cette expérience le facteur 4 de dilution est en moyenne bien respecté après quantification des protéines totales présentes dans chaque piste, après coloration au Sypro Ruby. Nous pouvons donc conclure que dans une gamme allant de 5 à 80µg de protéines cette coloration est quantitative. De plus, la coloration ne réduit pas le signal d'immunodétection.

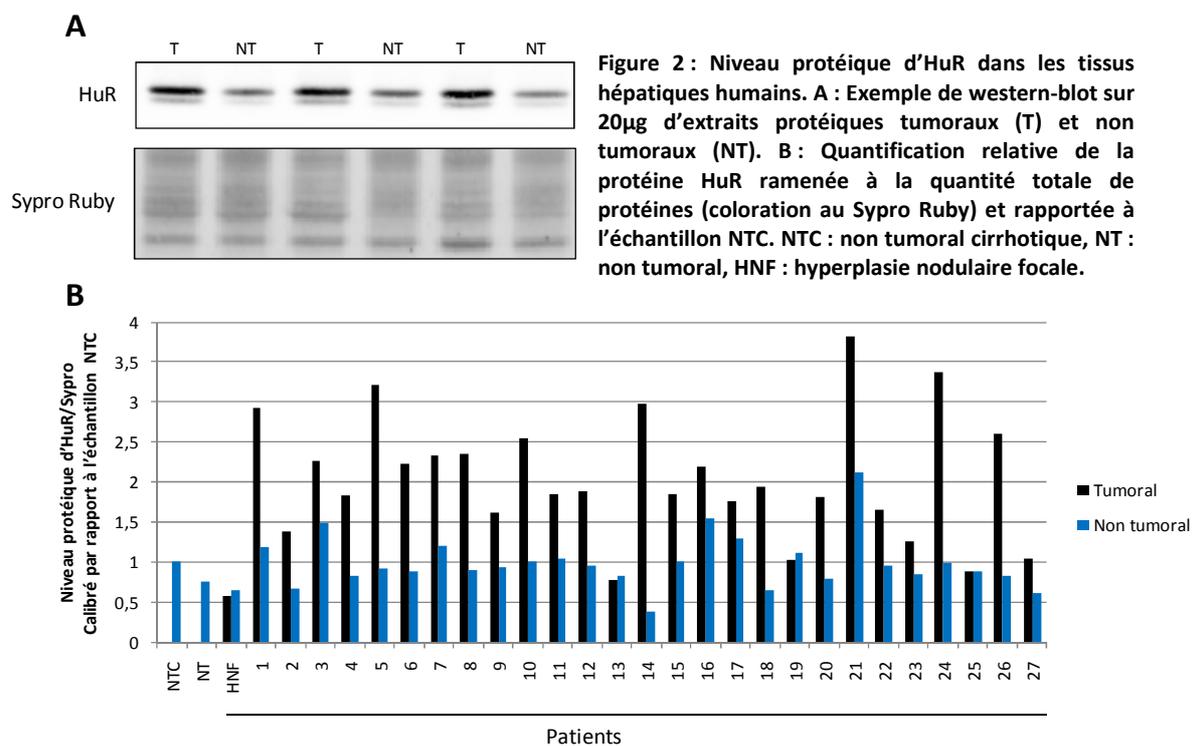
Ultérieurement, le niveau d'expression d'HuR a été mesuré en utilisant 20µg de protéines totales, pour se placer dans la gamme de quantité où la coloration au Sypro Ruby est linéaire.

B. Expression dans les tissus humains

Le niveau protéique d'HuR a été analysé par western-blot sur des extraits protéiques totaux issus de 27 patients atteints de CHC et 3 patients contrôles : un patient atteint d'une tumeur bénigne du foie (hyperplasie nodulaire focale) et deux patients sans tumeur dont un atteint de cirrhose. Le choix des patients a été effectué de manière aléatoire, cependant il existe un biais au niveau des caractéristiques cliniques, avec des CHC développés principalement à partir d'une infection au virus de l'hépatite C ou d'un syndrome métabolique et présentant une activité cirrhotique

importante (voir paragraphe Matériels et Méthodes). Ce biais correspond à des facteurs étiologiques retrouvés au niveau de notre pays. Dans cette première partie des résultats, l'objectif étant d'analyser l'expression d'HuR de façon globale dans le CHC, les caractéristiques étiologiques des patients ne sont pas indiquées. Les éventuelles corrélations entre le niveau d'expression d'HuR et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients seront discutées par la suite.

La comparaison entre l'extrait issu de la tumeur et l'extrait péri-tumoral correspondant, pour chaque patient atteint de CHC, a permis de montrer que la quantité de protéine HuR est significativement augmentée dans les tissus hépatiques tumoraux (*Figure 2*).



HuR est surexprimée chez 24 patients sur les 27 analysés, soit 89% d'entre-eux. En moyenne, la protéine est surexprimée de 2,2 fois dans les tumeurs par rapport aux tissus péri-tumoraux, et la médiane de surexpression est de 1,9 fois. Toutes ces données prises dans leur ensemble (*Figure 3*) permettent de conclure que le niveau

protéique d'HuR est significativement ($p < 0,0001$) augmenté dans le tissu tumoral hépatique.

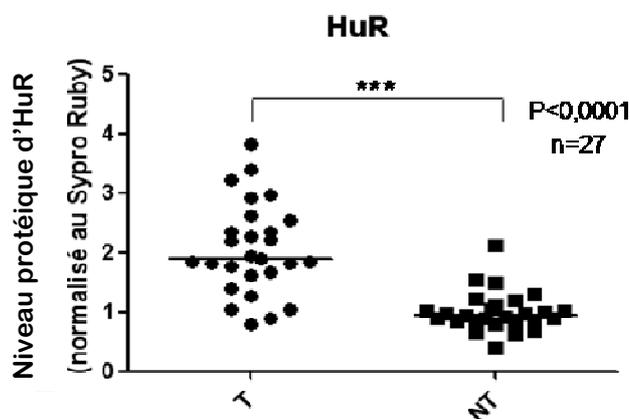


Figure 3 : Ensemble des quantifications pour les 27 patients. La médiane des valeurs est indiquée par un trait horizontal. Les données ont été analysées par le test de Wilcoxon.

C. Analyse immunohistochimique

Parce que les tissus utilisés pour la préparation des extraits protéiques peuvent présenter une hétérogénéité cellulaire, nous avons poursuivi notre étude de l'expression d'HuR par marquage immunohistochimique sur 14 des patients analysés précédemment pour examiner le profil d'expression d'HuR dans les tissus.

Comme nous pouvons le voir sur la figure suivante (**Figure 4**), le tissu hépatique péri-tumoral, chez ce patient, est composé de cellules biliaires et de cellules inflammatoires qui expriment fortement la protéine HuR. Ceci nous laisse donc penser que les quantités de protéine, mesurées par western-blot, doit probablement être sous-estimée par rapport à la réalité. Effectivement dans une étude récente (Vazquez-Chantada, Fernandez-Ramos et al. 2010), les auteurs ont mesuré, sur des tissus de patient, par immunofluorescence, une surexpression de la protéine d'environ 5 fois entre des hépatocytes tumoraux et des hépatocytes non tumoraux.

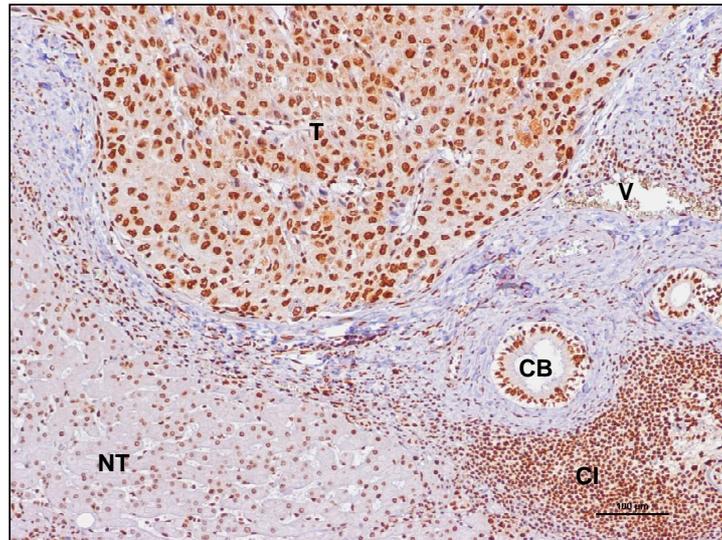


Figure 4 : Mise en évidence de l'expression d'HuR dans d'autres types cellulaires que les hépatocytes dans le tissu péri-tumoral. T : tumoral, NT : non tumoral, CB : canal biliaire, V : veine, CI : cellules inflammatoires.

Malgré l'aspect hétérogène du marquage d'HuR dans le tissu péri-tumoral, l'augmentation du niveau de la protéine HuR dans les hépatocytes tumoraux par rapport aux hépatocytes péri-tumoraux est évidente (*Figure 5*).

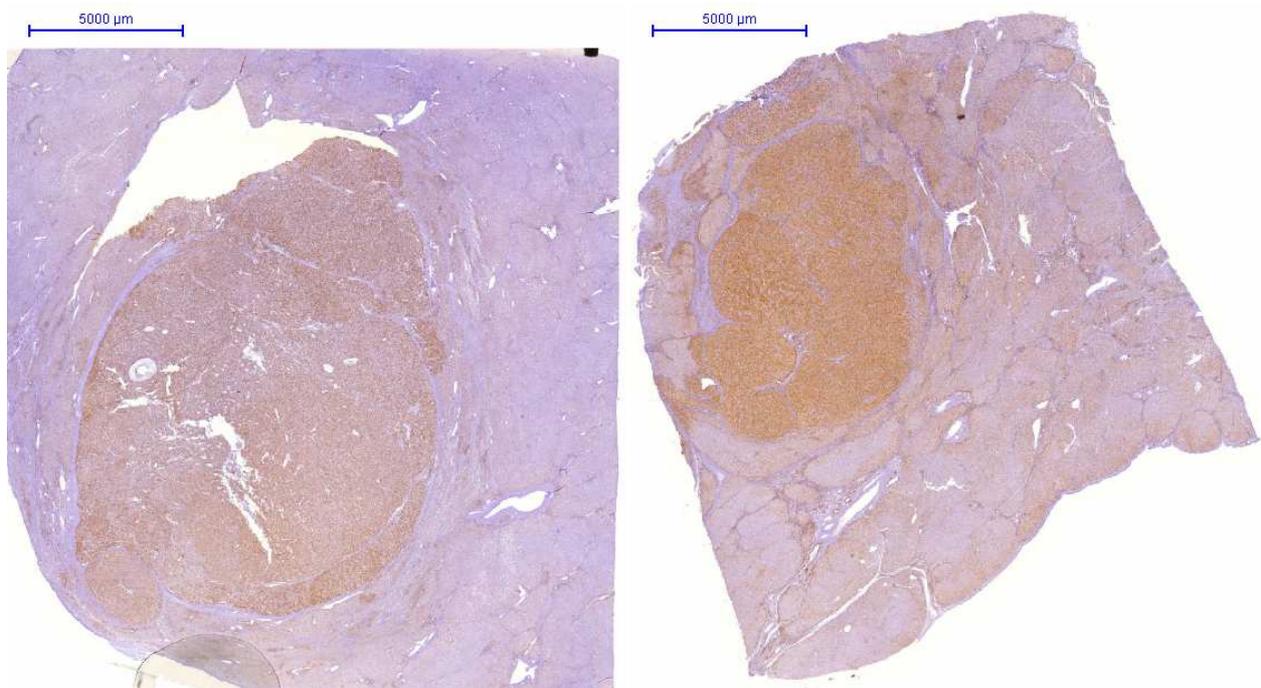


Figure 5 : Mise en évidence de la surexpression d'HuR dans les hépatocytes tumoraux chez 2 patients atteint de CHC.

Si l'on s'intéresse de plus près au marquage des hépatocytes, nous pouvons voir que la protéine HuR n'est pratiquement pas présente chez les hépatocytes d'un patient sain (**Figure 6A**). En ce qui concerne les hépatocytes péri-tumoraux, on commence à observer un marquage un peu plus important d'HuR qui reste cependant restreint au niveau nucléaire (**Figure 6B**). Pour finir, les hépatocytes tumoraux expriment très fortement HuR, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (**Figure 6C**).

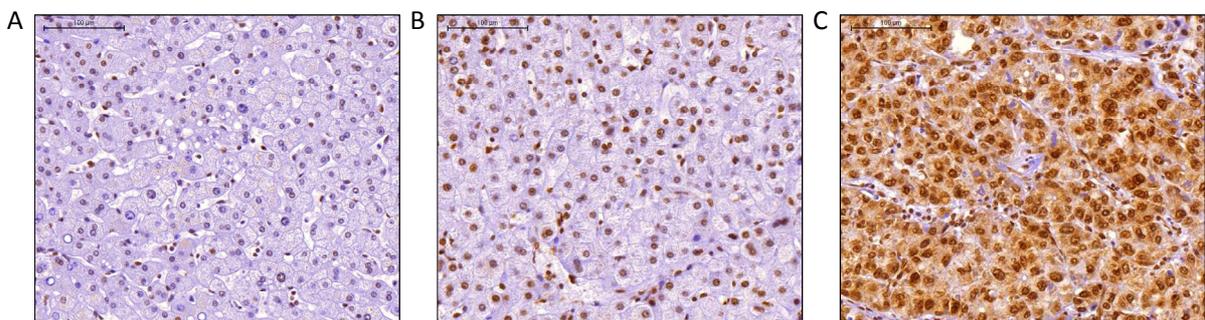


Figure 6 : Marquage de la protéine HuR au niveau d'hépatocytes non tumoraux (A), d'hépatocytes péri-tumoraux (B) et d'hépatocytes tumoraux (C).

Pour compléter l'analyse, l'ensemble des marquages immunohistochimiques de la protéine HuR sur les coupes de tissus de patients atteints de CHC est en cours d'analyse par un médecin anatomopathologiste.

D. Expression dans les lignées cellulaires

Les analyses fonctionnelles de la protéine HuR dans le CHC (surexpression, ARN interférence,...) ne pouvant pas être réalisées sur les tissus, elles devront être effectuées sur des lignées cellulaires. Il était important pour cela d'identifier le ou les modèles cellulaires les plus appropriés. Le niveau de la protéine a été comparé entre 8 lignées cellulaires issues de CHC, dont 3 tumeurs infantiles, HepG2, HuH6 et

Hep3B, une lignée issue de métastase, H2M (provenant de la tumeur primaire H2P) et des hépatocytes non tumoraux primaires (**Figure 7**).

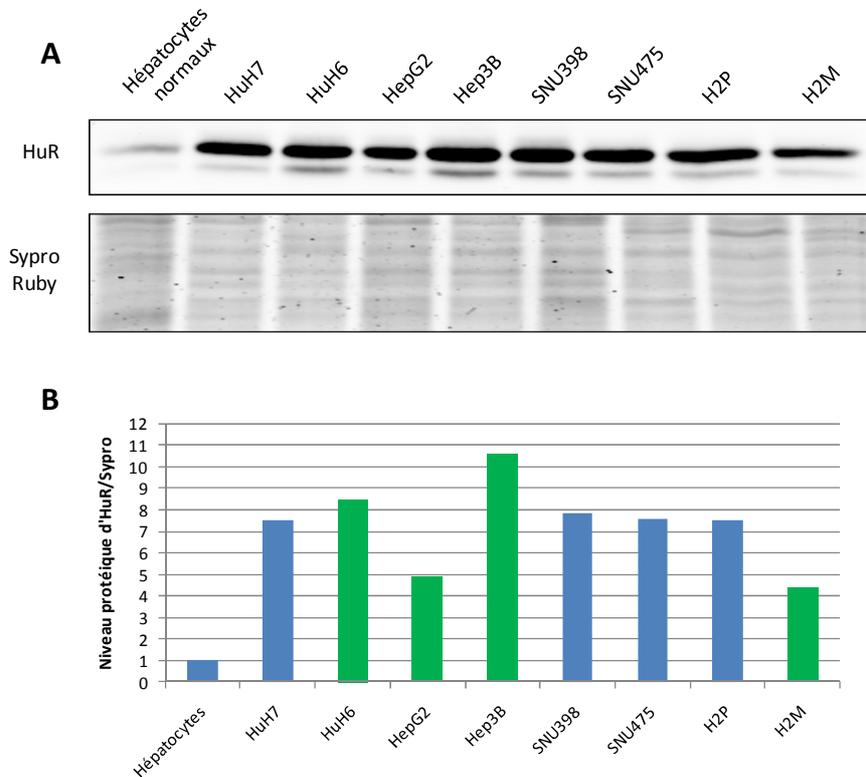


Figure 7 : Niveau de la protéine HuR dans les lignées cellulaires de CHC. A : Western-blot sur des extraits protéiques totaux (20µg). B : Quantification relative de la protéine HuR ramenée à la quantité totale de protéines (coloration au Sypro Ruby) et aux hépatocytes normaux. Les lignées provenant d'une tumeur infantile ou d'une métastase sont indiquées en vert.

Le niveau de la protéine HuR est augmenté dans toutes les lignées tumorales par rapport aux hépatocytes normaux. De plus, le profil d'expression est similaire dans les lignées issues de CHC, avec une surexpression d'environ 7 fois.

Des fractionnements cellulaires ont été réalisés sur les différentes lignées pour déterminer la répartition d'HuR dans les cellules (**Figure 8**).

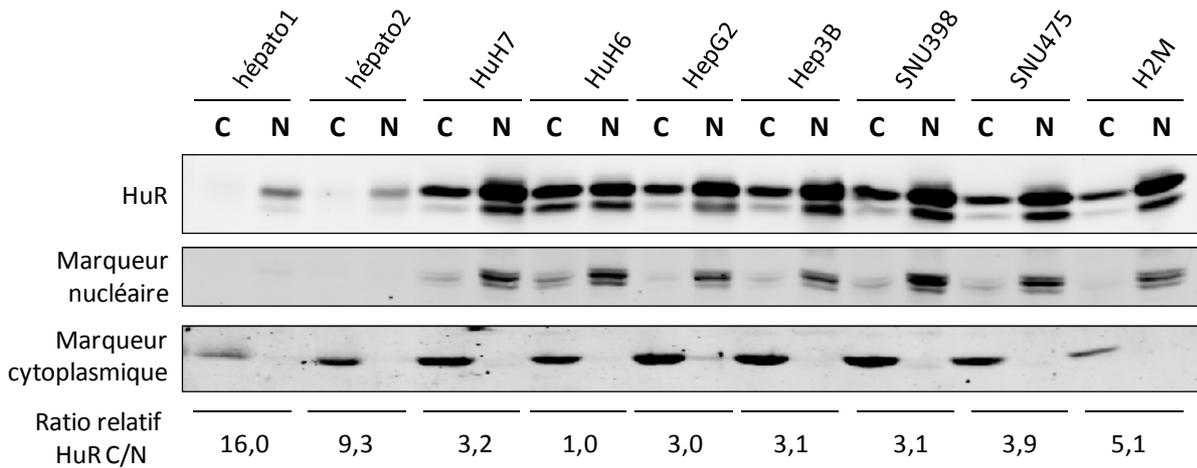


Figure 8 : Niveau de la protéine HuR dans des fractionnements cellulaires. N : noyau, C : cytoplasme. Le marqueur nucléaire correspond à la protéine U1snRNP70K et le marqueur cytoplasmique à la protéine GAPDH. Afin de respecter le ratio théorique entre le contenu du cytoplasme et du noyau, 10µg de protéines ont été utilisés pour les extraits nucléaires et 30µg pour les extraits cytoplasmiques.

L'enrichissement cytoplasmique, décrit dans la littérature (voir paragraphe II.D.2) et observé dans les tissus (voir ci-dessus), est retrouvé dans ces lignées. Effectivement, par comparaison avec les fractionnements effectués sur les hépatocytes normaux, on s'aperçoit que dans les lignées, d'une part on observe une augmentation du niveau cytoplasmique d'HuR et d'autre part que son niveau d'expression nucléaire est également augmenté. Pour confirmer ces résultats, des marquages immunohistochimiques ont été effectués sur les cellules HuH7 (Figure 9).

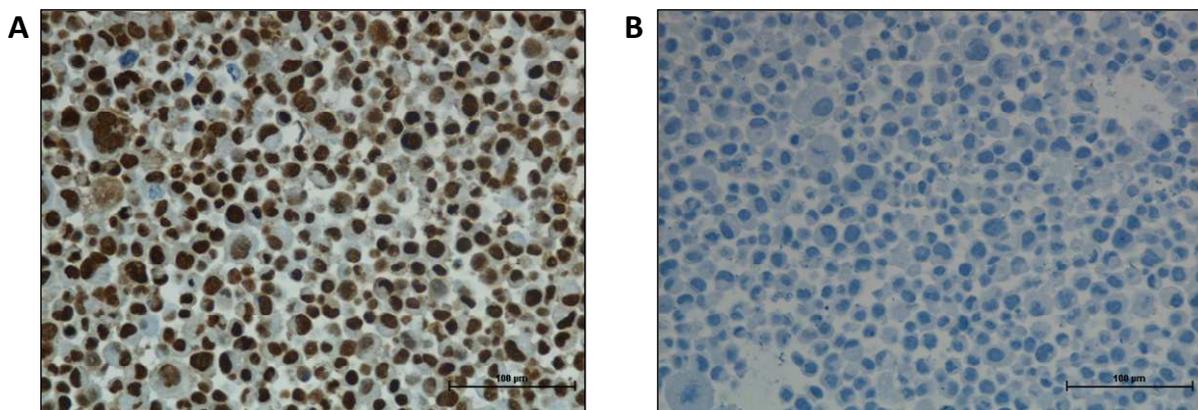


Figure 9 : Marquage immunohistochimique de la protéine HuR dans la lignée de CHC HuH7. A : en présence d'anticorps primaires anti-HuR, B : en absence d'anticorps primaire (contrôle négatif de spécificité de marquage).

Le marquage immunohistochimique d'HuR montre que la protéine est très fortement exprimée dans la lignée tumorale HuH7, avec une expression nucléaire très forte, et une expression cytoplasmique moins forte mais présente.

L'analyse du niveau protéique d'HuR dans les différentes lignées tumorales corrèle avec les données obtenues précédemment dans les tissus. Cependant la surexpression observée dans les lignées cellulaires est plus importante que celle observée dans les tissus humains. Cette différence peut s'expliquer par l'aspect hétérogène du tissu hépatique. Effectivement comme observé sur les marquages réalisés sur les tissus, différents types cellulaires expriment fortement HuR. L'autre facteur important à prendre en compte est le fait que les tumeurs se développent généralement sur des tissus pathologiques (inflammation, cirrhose, etc.) présentant déjà un niveau d'expression d'HuR élevé (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003). Ces éléments ont tendance à sous-évaluer la surexpression observée par western-blot sur les tissus hépatiques humains. L'autre aspect à prendre en compte est le fait que les hépatocytes primaires, utilisés comme référent pour les lignées cellulaires, ne sont pas des cellules en division et semblent exprimer faiblement les protéines testées (ex : le marqueur cytoplasmique), ce qui pourrait surévaluer la surexpression d'HuR dans les lignées.

En conclusion, les différentes lignées cellulaires de CHC présentant un profil d'expression identique pour la protéine HuR, le choix du modèle cellulaire pour les analyses fonctionnelles sera la lignée HuH7 pour sa facilité de manipulation (culture et transfection).

II. Expression de l'ARNm HuR dans le CHC

A. Corrélation entre le niveau de la protéine et de l'ARNm HuR

Nous nous sommes ensuite intéressés au taux d'ARNm HuR dans le CHC. Pour cela, le niveau d'ARNm a été mesuré par qRT-PCR sur des extraits tumoraux et non tumoraux de 19 patients, puis comparé au niveau de la protéine (**Figure 10**).

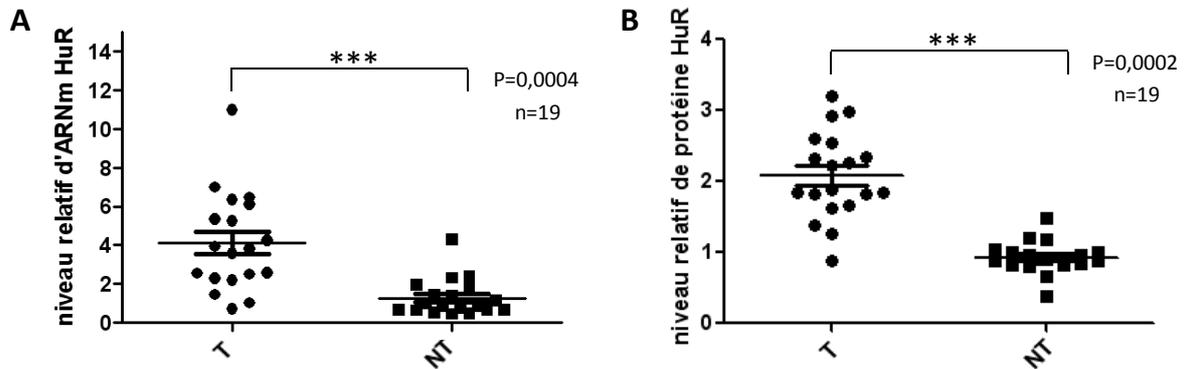


Figure 10 : Niveau de l'ARNm HuR mesurée par qRT-PCR (A) et niveau de la protéine HuR sur les mêmes patients (B). Les mesures ont été effectuées sur des extraits de tissus humains tumoraux (T) et péri-tumoraux (NT) de 19 patients atteints de CHC. Les données ont été analysées par le test de Wilcoxon.

Le taux d'ARNm HuR augmente de manière significative ($p=0,0004$) dans les tissus tumoraux avec une médiane de surexpression de 2,8 fois. Dans ces mêmes extraits, la protéine HuR présente une médiane de surexpression comparable de 2,1 fois.

Dans une étude réalisée sur la lignée cellulaire HeLa, il a été montré que des ARE-BPs, dont HuR, pouvaient se fixer sur l'ARNm d'HuR et le réguler post-transcriptionnellement (Pullmann, Kim et al. 2007), ce qui pourrait entraîner une différence entre le taux de l'ARNm et de la protéine. C'est pourquoi, pour chaque extrait ($n=38$; 19 extraits tumoraux et 19 extraits péri-tumoraux) les niveaux en ARNm et en protéine ont été comparés (**Figure 11**).

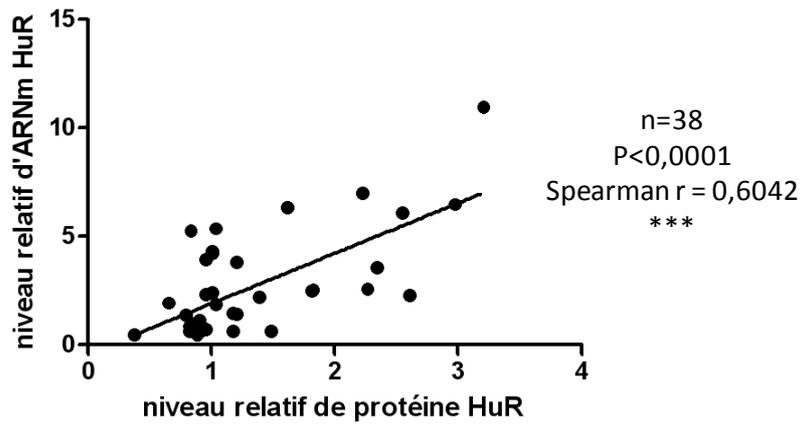


Figure 11 : Corrélation entre le taux d'ARNm et de protéine HuR sur les 38 échantillons traités. L'analyse statistique de corrélation a été effectuée par le test de Spearman.

Il ressort de cette analyse que le taux d'ARNm est significativement ($p < 0,0001$) corrélé au taux de la protéine à la fois dans les tissus tumoraux et les tissus non tumoraux. Ces résultats vont maintenant nous permettre d'étendre notre analyse de l'expression d'HuR sur une population de patients plus importante en utilisant les études transcriptomiques réalisées sur le CHC.

B. Analyse des données transcriptomiques

En collaboration avec l'équipe INSERM U674 de l'Université Paris 7 dirigée par le Pr Jessica Zucman-Rossi, nous avons extrait les données d'expression d'HuR à partir de l'étude transcriptomique réalisée sur 57 patients atteints de CHC à l'aide de puces Affymetrix HG-U133A (**Figure 12**) (Boyault, Rickman et al. 2007).

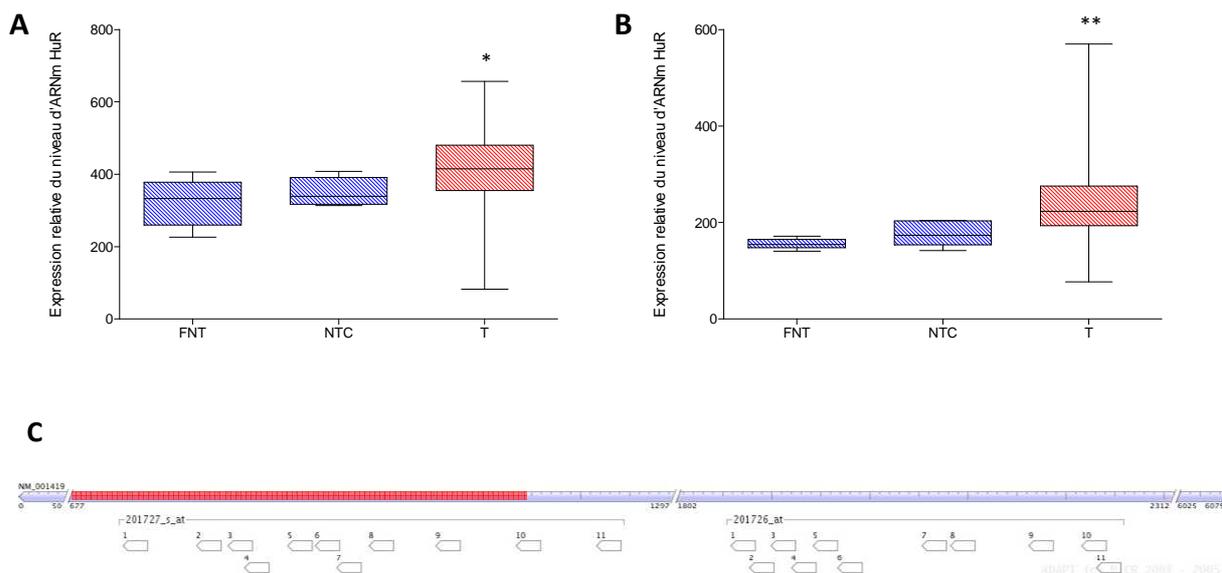


Figure 12 : Niveau d'ARNm HuR dans le CHC. Données extraites à partir de l'étude transcriptomique sur puce Affymetrix HG-U133A (Boyault, Rickman et al. 2007). FNT : foie non tumoral (n=5), NTC : non tumoral cirrhotique (n=5), T : tumoral (n=57). La figure A représente les données d'expression pour le jeu de sondes 201726_at et la figure B les données d'expression pour le jeu de sondes 201727_s_at. Les médianes d'expression des échantillons tumoraux (T) sont comparées aux médianes d'expression des échantillons non tumoraux (FNT) par le test statistique Kruskal-Wallis. La figure C représente la disposition des sondes sur le transcrit HuR, avec en rouge la séquence codante.

Nous avons donc pu étendre notre analyse de l'expression d'HuR sur un nombre plus important de patients (n=57). Ainsi, en comparant les échantillons tumoraux par rapport aux échantillons non tumoraux, nous confirmons l'augmentation du taux de l'ARNm HuR dans les tumeurs. Pour le jeu de sondes 201726_at, qui cible la région 3'NT de l'ARNm d'HuR, on obtient une surexpression significative (p=0,0221) avec une médiane de surexpression de 1,2 fois, et pour le jeu de sondes 201727_s_at, qui cible la région codante, on obtient une médiane de surexpression de 1,4 fois avec une significativité de p=0,0023. Les valeurs de surexpression obtenues ici sont inférieures à la valeur obtenue dans notre analyse (2,8 fois). Cet écart pourrait être dû soit aux méthodes d'analyse, puces à ADN versus qRT-PCR, ou bien au profil clinico-pathologique des patients étudiés.

Le profil d'expression d'HuR a ensuite été comparé à la classification établie par l'équipe du Pr Jessica Zucman-Rossi (voir paragraphe Introduction I.D.2.), afin de rechercher une corrélation entre le niveau d'expression d'HuR et les caractéristiques cliniques et génétiques des CHC (**Figure 13**).

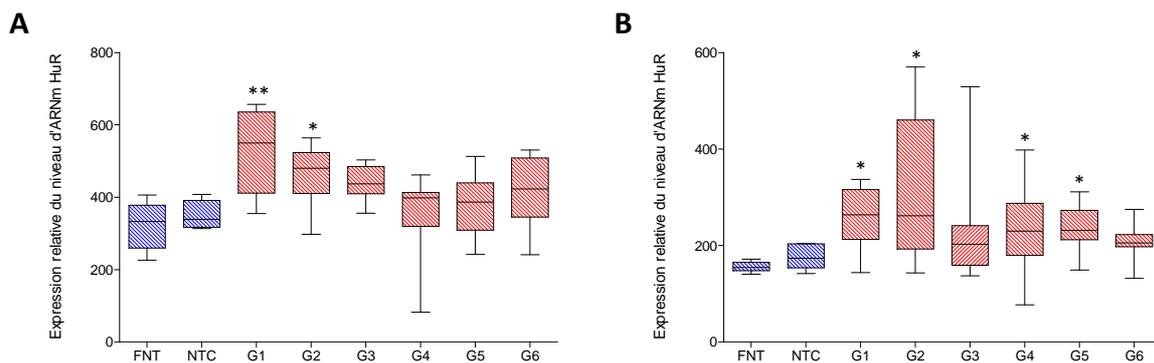


Figure 13 : Taux de l'ARNm d'HuR dans le CHC. Données extraites de l'étude transcriptomique sur puce Affymetrix HG-U133A (Boyault, Rickman et al. 2007). FNT : foie non tumoral (n=5), NTC : non tumoral cirrhotique (n=5), G1-G6 : sous groupes de CHC (G1 : n=6 ; G2 : n=6 ; G3 : n=9 ; G4 : n=17 ; G5 : n=11 ; G6 : n=8). La figure A représente les données d'expression pour le jeu de sondes 201726_at et la figure B les données d'expression pour le jeu de sondes 201727_s_at. Les médianes d'expression des échantillons des différents sous-groupes de CHC (G1-G6) sont comparées aux médianes d'expression des échantillons non tumoraux (FNT) par le test statistique Kruskal-Wallis.

Les médianes d'expression d'HuR dans les 6 sous-groupes de CHC sont situées au-dessus de la médiane d'expression des échantillons non tumoraux. Cependant, après traitement statistique, il ressort que la surexpression d'HuR n'est significative que dans certains sous-groupes de tumeurs. En ce qui concerne le jeu de sondes 201726_at (reconnaît la région 3'NT de l'ARNm), HuR est principalement surexprimé dans les groupes G1 et G2. Et en ce qui concerne le jeu de sondes 201727_s_at (reconnaît la région codante de l'ARNm), HuR est principalement surexprimé dans les groupes G1, G2, G4 et G5. En compilant ces données, on peut conclure que de manière générale, HuR présente des niveaux d'expression plus élevés dans les groupes G1 et G2. Les tumeurs appartenant à ces groupes sont associées à une infection virale par l'hépatite B, présentent une forte instabilité chromosomique et une prolifération cellulaire importante. Par ailleurs, ces tumeurs en plus de surexprimer des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération et le métabolisme de l'ADN, présentent une activation de la voie AKT, qui est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. De façon intéressante une étude récente a montré que HuR pouvait être un médiateur de la voie PI3K/AKT pour la régulation post-transcriptionnelle de DNMT3B (DNA Méthyltransférase 3B) traduisant ainsi une interconnection entre cette voie et la protéine HuR (Mei, Sun et al. 2010). De plus, les patients atteints de

CHC classés dans ces groupes ont un pronostic plus défavorable en termes de survie (Boyault, Rickman et al. 2007).

En conclusion, il a été montré que le niveau de protéine HuR est significativement plus important dans les tissus tumoraux de 27 patients atteints de CHC. De plus, la surexpression de la protéine a aussi été observée dans 8 lignées cellulaires issues de CHC. Ensuite, il a été montré que le niveau de l'ARNm d'HuR est également plus élevé dans le CHC, d'une part par une analyse par qRT-PCR sur 19 patients, et d'autre part par une analyse transcriptomique réalisée sur 57 patients. Grâce à cette dernière analyse, nous avons pu montrer que HuR est plus fortement exprimée dans les CHC présentant une prolifération cellulaire accrue, un caractère invasif et un pronostic défavorable, confirmant ainsi les données de la littérature sur d'autres types de cancers (voir paragraphe Introduction II.D.4.).

III. Identification des ARNm régulés par HuR dans le CHC

Afin d'identifier les processus cellulaires perturbés par l'augmentation de la quantité de protéine HuR dans le tissu cancéreux hépatique, l'étape suivante consiste à identifier de façon globale les ARNm sur lesquels HuR se fixe.

A. Identification des cibles d'HuR

1. Co-immunoprécipitation des ARNm associés à HuR

La protéine HuR a été immunoprécipitée dans des extraits cellulaires cytoplasmiques de la lignée HuH7. En parallèle, l'immunoprécipitation a été réalisée avec des anticorps non-relevants (IgG), du même isotype que les anticorps HuR,

pour vérifier la spécificité de purification. L'expérience a été réalisée 4 fois de façon indépendante et la spécificité de l'immunoprécipitation de la protéine a été analysée par western-blot (*Figure 14*).

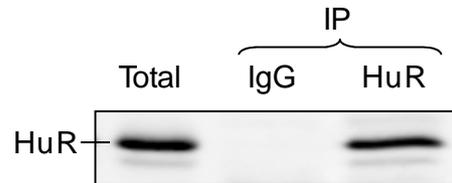


Figure 14 : Exemple de western-blot dirigé contre la protéine HuR après immunoprécipitation avec l'anticorps spécifique (HuR) et un anticorps irrelevant (IgG).

Le rendement de purification de la protéine a ensuite été quantifié pour les quatre immunoprécipitations (*Figure 15*). Ce rendement correspond à la quantité de protéine HuR immunoprécipitée (en %) par rapport à la quantité de protéine HuR présente dans l'extrait utilisé.

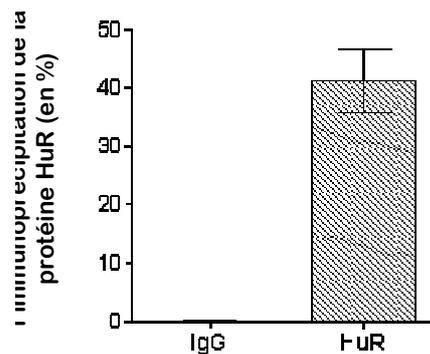


Figure 15 : Quantification du rendement de l'immunoprécipitation de la protéine HuR (moyenne \pm SEM).

Sur les 4 immunoprécipitations réalisées, nous pouvons voir que la purification de la protéine est bien spécifique et permet de purifier en moyenne 41% de protéine par

rapport à la quantité totale traitée. Après purification de la protéine HuR dans des extraits cytoplasmiques, les ARNm co-précipités avec la protéine ont été purifiés. L'enrichissement en ARNm a ensuite été analysé par qRT-PCR, d'une part pour l'ARNm de la GAPDH considéré comme un contrôle négatif car l'ARNm de la GAPDH n'est pas une cible de HuR, et d'autre part pour l'ARNm de la β -actine (ACTB) considéré comme un contrôle positif de fixation d'HuR car l'ARNm ACTB est une cible connue d'HuR (**Figure 16**).

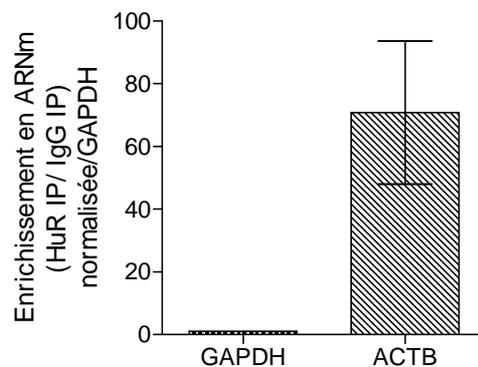


Figure 16 : Niveau d'enrichissement en ARNm après immunoprécipitation de la protéine HuR mesuré par qRT-PCR (moyenne \pm SEM).

Une fois normalisé à la GAPDH, l'enrichissement moyen en ARNm ACTB sur les 4 expériences est d'environ 70 fois, confirmant ainsi la spécificité d'enrichissement en ARNm fixés par la protéine HuR. Cependant, malgré la reproductibilité en ce qui concerne le niveau de purification de la protéine HuR, les niveaux d'enrichissement en ARNm sont très variables. Effectivement, l'enrichissement observé en ARNm ACTB se situe sur une fourchette allant de 41 fois jusqu'à 138 fois sur les 4 co-immunoprécipitations.

2. Analyse des résultats d'hybridation sur puce à ADN des ARNm associés à HuR

Afin d'identifier les transcrits fixés par HuR, les ARNm ont été hybridés sur puces à ADN Affymetrix HG-U133 Plus 2.0. Les quantités en ARNm récupérées après co-immunoprécipitation étant très faibles (en moyenne 40 ng), seuls les ARNm de deux co-immunoprécipitations sur les quatre réalisées ont pu être hybridés sur puces. De plus, les ARNm ont dû subir 2 étapes d'amplification au lieu d'une, avant l'étape d'hybridation. Cette procédure consiste tout d'abord à produire de l'ADNc double brin à partir de l'ARN total par une première étape de transcription inverse. Cette matrice dsADNc est ensuite utilisée pour produire de l'ARN par transcription *in vitro* (=1^{ère} amplification). L'ARN ainsi synthétisé est ensuite utilisé pour produire à nouveau de l'ADNc double brin par une deuxième étape de transcription inverse suivie d'une deuxième étape de transcription *in vitro* (=2^{ème} amplification). L'ARN ainsi obtenu après cette double amplification, et marqué lors de la deuxième transcription *in vitro*, est utilisé pour l'hybridation sur puces à ADN.

Il était donc nécessaire de vérifier que les niveaux d'enrichissement observés ne soient pas modifiés lors de ces étapes d'amplification. Pour cela une fraction des ARN produits après deux cycles d'amplification a pu être récupérée et les niveaux en ACTB et GAPDH ont été mesurés par qRT-PCR (**Figure 17**).

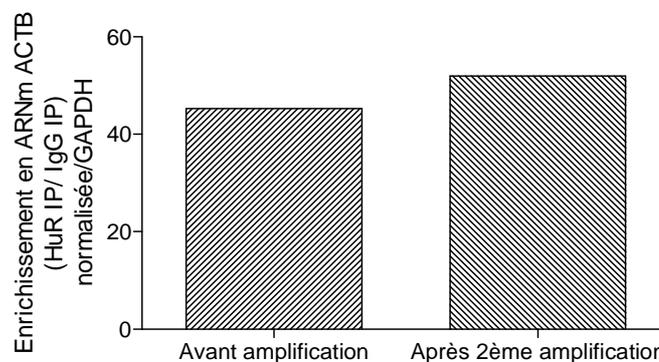


Figure 17 : Niveau d'enrichissement en ACTB, avant et après l'amplification des ARNm, mesuré par qRT-PCR.

Le niveau d'enrichissement en ACTB avant et après l'étape d'amplification reste identique, démontrant ainsi que l'amplification ne devrait pas modifier l'analyse quantitative des données transcriptomiques.

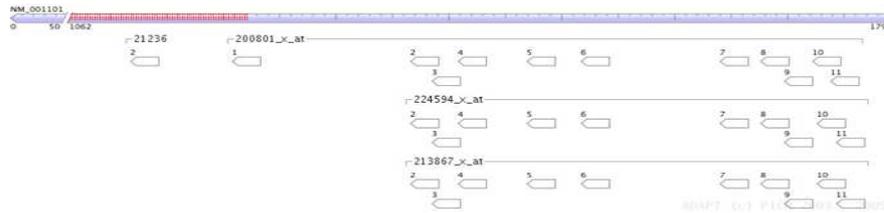
Les données issues des puces à ADN ont été traitées statistiquement afin de n'identifier que les transcrits enrichis significativement d'au moins un facteur 3 dans les fractions HuR par rapport aux fractions contrôles. Cette analyse a permis de mettre en évidence 1349 sondes spécifiquement enrichies dans les deux co-immunoprécipitations de la protéine HuR (voir annexe 1).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux sondes de l'ACTB et de la GAPDH, servant de contrôle, afin de vérifier les enrichissements observés précédemment par qRT-PCR avant hybridation sur puces (*Figure 18*).

A

Gene	Sonde	Signal IP-HuR	Signal IP-IgG	Enrichissement
ACTB	200801_x_at	13,7	12,5	+2,3 fois
	224594_x_at	13,6	12,9	+1,6 fois
	213867_x_at	13,6	13,0	+1,5 fois
GAPDH	217398_x_at	7,9	8,1	-1,1 fois
	213453_x_at	8,0	8,3	-1,2 fois
	212581_x_at	8,5	9,0	-1,4 fois

B



C

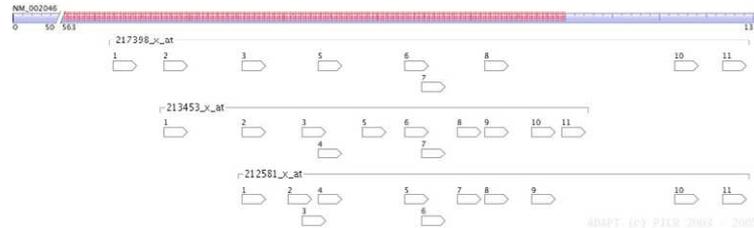


Figure 18 : Valeurs des signaux IP-HuR et IP-IgG extraites des puces à ADN pour les différentes sondes ACTB et GAPDH (A). Les valeurs sont exprimées en Log2 et représentent la moyenne des 2 expériences. Les valeurs positives d'enrichissement représentent un enrichissement dans la fraction IP-HuR et les valeurs négatives un enrichissement dans la fraction IP-IgG. Les sondes spécifiques d'ACTB (B) et de la GAPDH (C) sont alignées sur la séquence de leur transcrite. La séquence codante des transcrits est représentée en rose.

Comme attendu au niveau des sondes représentatives du transcrite GAPDH, nous n'observons aucun enrichissement dans la fraction IP-HuR. En ce qui concerne le transcrite ACTB, les enrichissements observés dans la fraction IP-HuR sont beaucoup plus faibles que prévus. Mais, les valeurs du signal pour les sondes ACTB dans la fraction IP-IgG sont proches de la saturation et dans la fraction IP-HuR sont saturantes, ce qui explique que les valeurs mesurées par qRT-PCR ne soient pas identiques aux valeurs observées sur les puces.

3. *Analyse des données transcriptomiques*

a) *Comparaison de nos données à celles de la littérature*

(1) *Niveau global*

Dans une étude réalisée en 2004 (Lopez de Silanes, Zhan et al. 2004) visant à déterminer la séquence consensus de fixation de la protéine HuR sur les ARNm, les auteurs ont immunoprécipité la protéine HuR dans des cellules RKO (lignée cellulaire de carcinome colorectal) et analysé les cibles par cDNA array. Les auteurs ont identifié, sans seuil d'enrichissement, 779 cibles dans leur étude. Ces 779 cibles ont été comparées à nos 19387 cibles (nombre obtenu sans seuil d'enrichissement). Il apparaît que 406 cibles sont communes aux deux listes, soit 52% des cibles retrouvées dans les cellules RKO. Le fait que seulement 406 cibles soient communes aux deux listes peut s'expliquer d'une part par le fait que le nombre de gènes analysés sur les puces soit différent (9600 dans le cas de l'étude réalisée en 2004 et 38500 dans notre étude). D'autre part ces 2 études ont été réalisées sur des lignées cellulaires différentes et donc, l'enrichissement des transcrits dans les immunoprécipitations est dépendant de l'expression de ceux-ci dans les différents types cellulaires. Pour illustrer ceci, une étude plus récente (Calaluce, Gubin et al. 2010) a identifié les cibles d'HuR par RIP-Chip (RNA immunoprecipitation hybridized to microarray) dans deux types cellulaires différents mais provenant tous deux d'un cancer du sein. Si l'on s'intéresse uniquement aux gènes annotés enrichis d'au moins un facteur 4 (condition utilisée par les auteurs), on retrouve 83 cibles spécifiques à la lignée MCF-7, 50 cibles à la lignée MDA-MB-231 et 19 cibles communes aux deux lignées. Puis nous avons comparé ces résultats avec nos données de RIP-Chip, en appliquant, pour comparaison, un seuil d'enrichissement de 4 fois à nos données, soit 608 gènes annotés identifiés. Ainsi, 13% des cibles d'HuR (11 gènes) dans la lignée MCF-7 et 32% (16 gènes) dans la lignée MDA-MB-231 sont retrouvés dans notre liste (*Figure 19*).

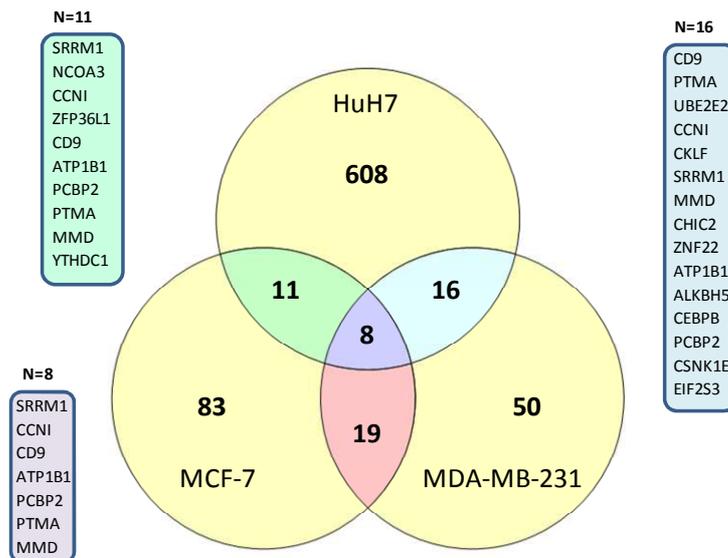


Figure 19 : Diagramme de Venne représentant les cibles communes de la protéine HuR dans 3 lignées cellulaires différentes. Nos données de RIP-Chip obtenues sur Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 (représentatif de 47400 transcrits) sur les cellules HuH7 ont été comparées aux données de RIP-Chip obtenues sur Illumina Sentrix Human WG-6 (représentatif de 47293 transcrits) avec les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Calaluca, Gubin et al. 2010). La comparaison a été effectuée sur les gènes enrichis d'au moins un facteur 4 dans la fraction HuR par rapport à la fraction contrôlée.

(2) Niveau individuel

Parmi les gènes qui se dégagent de notre analyse, on retrouve des cibles d'HuR déjà décrites dans la littérature et engagées dans les phénotypes cancéreux comme par exemple le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et la cycline D1 (CCND1), impliqués dans la promotion de la prolifération cellulaire, la prothymosin- α (PTMA) et c-myc, impliqués dans la résistance à l'apoptose, la thrombospondin-1 (THBS1) et le facteur de transcription RUNX1, impliqués dans l'angiogenèse ou encore le récepteur nucléaire NCOA3 impliqué dans l'invasion et les métastases.

b) Analyse ontologique

Afin d'avoir une vue plus large sur les processus biologiques dans lesquels HuR pourrait avoir un rôle et les fonctions moléculaires des cibles d'HuR, les 1349 cibles précédemment identifiées ont été analysées à l'aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (*Figure 20 et 21*).

Category	Term	Count	%	PValue
MF00042	Nucleic acid binding	169	15,6	1,55E-04
MF00039	Other transcription factor	36	3,3	1,66E-04
MF00053	Other RNA-binding protein	22	2,0	3,47E-04
MF00170	Ligase	38	3,5	1,53E-03
MF00065	mRNA processing factor	16	1,5	3,09E-03
MF00107	Kinase	51	4,7	4,88E-03
MF00108	Protein kinase	41	3,8	6,92E-03
MF00114	Protein phosphatase	16	1,5	8,31E-03
MF00036	Transcription factor	124	11,4	1,09E-02
MF00283	Ubiquitin-protein ligase	21	1,9	1,23E-02
MF00070	Chromatin/chromatin-binding protein	15	1,4	1,65E-02
MF00113	Phosphatase	23	2,1	2,02E-02
MF00100	G-protein modulator	30	2,8	2,05E-02
MF00261	Actin binding cytoskeletal protein	29	2,7	2,30E-02
MF00284	Other ligase	14	1,3	2,39E-02
MF00101	Guanyl-nucleotide exchange factor	14	1,3	2,53E-02
MF00215	Cysteine protease	12	1,1	3,39E-02
MF00014	Serine/threonine protein kinase receptor	5	0,5	4,37E-02
MF00093	Select regulatory molecule	72	6,6	5,05E-02
MF00067	mRNA polyadenylation factor	4	0,4	5,24E-02
MF00255	Non-motor microtubule binding protein	8	0,7	7,43E-02
MF00091	Cytoskeletal protein	52	4,8	8,20E-02
MF00072	Translation initiation factor	7	0,6	8,70E-02

Figure 20 : Classification des différentes fonctions moléculaires (MF) des cibles d'HuR. L'analyse a été réalisée sur les cibles enrichies d'au moins un facteur 3 dans les expériences de RIP-Chip, soit un total de 1349 cibles. Après interrogation des banques de données à l'aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sur les 1349 cibles proposées, 1083 correspondent à des gènes annotés. En utilisant les paramètres d'analyse suivants : count ≥ 2 et p-value $\leq 0,1$; 604 gènes sur les 1083 analysés n'ont pas pu être classés dans une fonction moléculaire particulière. La colonne « count » représente le nombre de gènes retrouvés dans la fonction moléculaire concernée, la colonne « % » représente le pourcentage de gènes impliqués dans la fonction par rapport au nombre total de gènes ayant servi à l'analyse (soit 1083). Les différentes fonctions ont été classées en fonction de leur significativité par p-value croissante.

Parmi les principales cibles de la protéine HuR, il y a une grande majorité d'ARNm codant pour des protéines de liaison à l'ADN et à l'ARN, dont une grande quantité de facteurs de transcription. On retrouve ensuite des transcrits codant pour des protéines régulatrices (protéines kinases, protéines phosphatases, protéines-G, etc.) ainsi que des protéines du cytosquelette.

Les transcrits ont ensuite été analysés en fonction des processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (*Figure 21*).

Category	Term	Count	%	PValue
BP00031	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	209	19,3	5,67E-06
BP00063	Protein modification	86	7,9	1,03E-04
BP00285	Cell structure and motility	80	7,4	8,02E-04
BP00060	Protein metabolism and modification	174	16,1	1,07E-03
BP00047	Pre-mRNA processing	27	2,5	1,09E-03
BP00040	mRNA transcription	122	11,3	1,62E-03
BP00046	Other mRNA transcription	6	0,6	4,24E-03
BP00207	Cell cycle control	34	3,1	5,02E-03
BP00125	Intracellular protein traffic	68	6,3	6,00E-03
BP00224	Cell proliferation and differentiation	69	6,4	7,19E-03
BP00064	Protein phosphorylation	48	4,4	8,02E-03
BP00048	mRNA splicing	19	1,8	9,46E-03
BP00203	Cell cycle	65	6,0	9,81E-03
BP00179	Apoptosis	39	3,6	1,53E-02
BP00263	Inhibition of apoptosis	14	1,3	1,59E-02
BP00286	Cell structure	46	4,2	2,33E-02
BP00281	Oncogenesis	32	3,0	3,18E-02
BP00044	mRNA transcription regulation	87	8,0	4,93E-02
BP00049	mRNA polyadenylation	5	0,5	5,31E-02
BP00109	Receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	6	0,6	5,47E-02
BP00276	General vesicle transport	20	1,8	5,72E-02
BP00075	Other protein metabolism	6	0,6	7,11E-02
BP00265	Oncogene	10	0,9	7,36E-02
BP00273	Chromatin packaging and remodeling	15	1,4	8,16E-02
BP00136	Other intracellular protein traffic	7	0,6	8,75E-02
BP00114	MAPKKK cascade	15	1,4	9,08E-02
BP00129	Endocytosis	20	1,8	9,64E-02

Figure 21 : Classification des différents processus biologiques (BP) dans lesquels les cibles d’HuR sont représentées. L’analyse a été réalisée sur les cibles enrichies d’au moins un facteur 3 dans les expériences de RIP-Chip, soit un total de 1349 cibles. Après interrogation des banques de données à l’aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sur les 1349 cibles proposées, 1083 correspondent à des gènes annotés. En utilisant les paramètres d’analyse suivants : count ≥ 2 et p-value $\leq 0,1$; 558 gènes sur les 1083 analysés n’ont pas pu être classés dans un processus biologique particulier. La colonne « count » représente le nombre de gènes retrouvés dans le processus biologique concerné, la colonne « % » représente le pourcentage de gènes impliqués dans le processus par rapport au nombre total de gènes ayant servis à l’analyse (soit 1083). Les différents processus biologiques ont été classés en fonction de leur significativité par p-value croissante.

D’après cette analyse, la protéine HuR serait impliquée dans au moins 27 processus biologiques, dont une grande partie concerne la régulation de l’expression génique. Parmi ces processus on trouve le compactage et le remodelage de la chromatine, le métabolisme de l’ADN et de nombreux processus impliqués dans le métabolisme de l’ARN dont certains faisant partie des régulations post-transcriptionnelles comme par exemple les mécanismes d’épissage et de polyadénylation. Il est intéressant de noter que certaines cibles d’HuR sont également retrouvées dans le métabolisme et le transport protéique. Pour finir, de nombreuses cibles d’HuR sont également impliquées dans des processus biologiques favorisant le développement tumoral, parmi lesquels le contrôle de la structure et de la motilité cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire et la régulation de l’apoptose. Comme on peut le voir dans cette analyse la protéine HuR pourrait jouer un rôle dans de nombreux processus cellulaires. Ainsi, la protéine HuR, en plus de son action directe sur des oncogènes, pourrait participer à la carcinogenèse en régulant la stabilité et/ou la traduction de transcrits impliqués soit dans des phénotypes pro-tumoraux (apoptose, prolifération, motilité) soit dans des voies plus générales permettant de réguler l’expression (régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et post-traductionnelle) de gènes importants dans le cancer.

Pour compléter ces analyses bioinformatiques, les différentes voies cellulaires dans lesquelles les cibles de la protéine HuR sont impliquées ont été classées dans la figure suivante (*Figure 22*).

Category	Term	Count	%	PValue
hsa04310	Wnt signaling pathway	27	2,5	3,48E-07
hsa04520	Adherens junction	15	1,4	1,05E-04
hsa05130	Pathogenic Escherichia coli infection	12	1,1	3,38E-04
hsa05215	Prostate cancer	15	1,4	5,08E-04
hsa05216	Thyroid cancer	8	0,7	1,04E-03
hsa04350	TGF-beta signaling pathway	14	1,3	1,31E-03
hsa05200	Pathways in cancer	33	3,0	2,10E-03
hsa04120	Ubiquitin mediated proteolysis	18	1,7	2,13E-03
hsa04114	Oocyte meiosis	15	1,4	4,09E-03
hsa05210	Colorectal cancer	12	1,1	8,46E-03
hsa04210	Apoptosis	12	1,1	1,09E-02
hsa04916	Melanogenesis	13	1,2	1,11E-02
hsa04720	Long-term potentiation	10	0,9	1,55E-02
hsa04730	Long-term depression	10	0,9	1,69E-02
hsa05221	Acute myeloid leukemia	9	0,8	1,74E-02
hsa04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	12	1,1	2,03E-02
hsa05214	Glioma	9	0,8	2,75E-02
hsa05213	Endometrial cancer	8	0,7	2,87E-02
hsa03040	Spliceosome	14	1,3	2,92E-02
hsa05014	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	8	0,7	3,15E-02
hsa05219	Bladder cancer	7	0,6	3,21E-02
hsa04530	Tight junction	14	1,3	4,49E-02
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	9	0,8	6,63E-02
hsa04910	Insulin signaling pathway	13	1,2	8,92E-02

Figure 22 : Classification des différentes voies cellulaires dans lesquelles les cibles d’HuR sont représentées. L’analyse a été réalisée sur les cibles enrichies d’au moins un facteur 3 dans les expériences de RIP-Chip, soit un total de 1349 cibles. Après interrogation des banques de données à l’aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sur les 1349 cibles proposées, 1083 correspondent à des gènes annotés. En utilisant les paramètres d’analyse suivants : count ≥ 2 et p-value $\leq 0,1$; 951 gènes sur les 1083 analysés n’ont pas pu être classés dans une voie particulière. La colonne « count » représente le nombre de gènes retrouvés dans la voie cellulaire concernée, la colonne « % » représente le pourcentage de gènes impliqués dans la voie par rapport au nombre total de gènes ayant servis à l’analyse (soit 1083). Les différentes voies ont été classées en fonction de leur significativité par p-value croissante.

Parmi les 24 voies qui se dégagent de cette analyse, de nombreuses voies concernent différents cancers : prostate, thyroïde, vessie, etc.. Parmi les cibles d’HuR les plus représentées dans ces différents cancers, on retrouve un ensemble de gènes extrêmement bien décrits dans la littérature comme participant à la tumorigenèse : les proto-oncogènes Ras/Raf, les facteurs de transcription p53 et LEF/TCF ainsi que la cycline D1 et la β -caténine. Pour illustrer ceci, les principales voies impliquées dans les cancers ainsi que les cibles de la protéine HuR sont représentées dans la figure suivante (*Figure 23*).

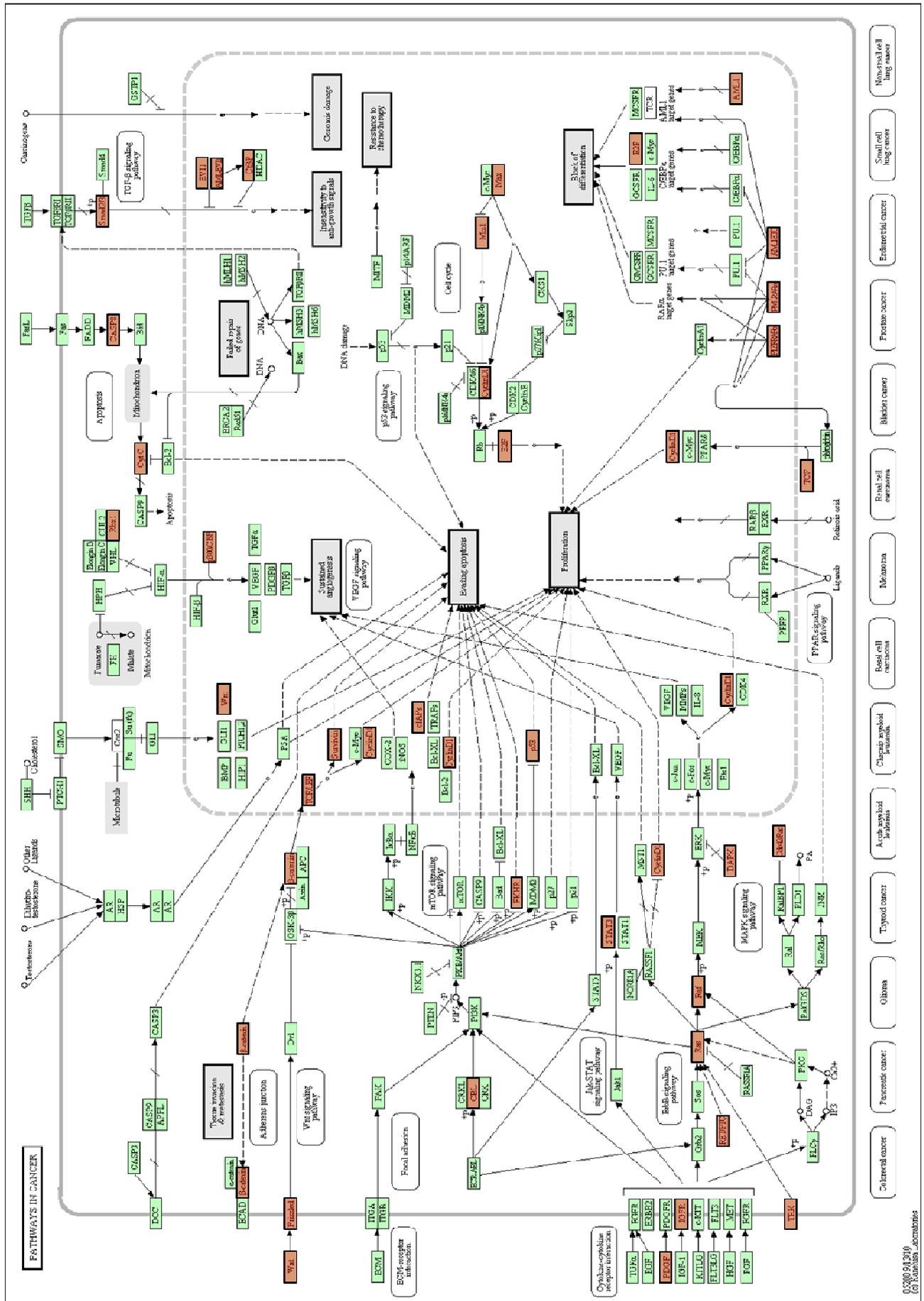


Figure 23 : Représentation schématique des principales voies cellulaires impliquées dans les cancers (banque de données : hsa05200). Les cibles de la protéine HuR sont représentées en rouge.

Comme on peut le voir sur le schéma ci-dessus, HuR serait capable d'agir sur de nombreuses voies pro-tumorales comme la voie Jak-STAT, ErbB, mTOR, p53 ou bien Wnt/ β -caténine, qui aboutissent toutes sur la régulation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de gènes impliqués dans la prolifération, la croissance, la motilité et la survie cellulaire (**Figure 23**). Cependant comme on peut le voir sur la figure 22, certaines voies sont plus enrichies en cibles d'HuR que d'autres, par exemple la voie Wnt/ β -caténine, la voie du TGF- β et la voie apoptotique.

B. Identification des ARNm régulés par HuR

L'identification d'un ARNm fixé par une protéine après immunoprécipitation n'implique pas que cet ARNm soit fixé *in vivo* à cette protéine (faux positif) et que l'expression de cet ARNm soit contrôlée par cette protéine.

Une étude réalisée en 2004 a montré que des complexes ribonucléoprotéiques pouvaient se former après la lyse cellulaire (Mili and Steitz 2004). De plus, des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe, ont montré que la protéine HuR était capable de s'associer *in vitro* au 3'NT du GPC3 (résultat confirmé par nos données de RIP-Chip (voir annexe 1)). Cependant après extinction de la protéine HuR par siRNAs dirigés contre l'ARNm d'HuR dans des cellules HuH7, le niveau en ARNm et en protéine du GPC3 n'était pas modifié.

Il nous a donc semblé nécessaire d'associer à nos données de Rip-Chip réalisées sur les cellules HuH7, une identification des ARNm régulés par HuR dans ces mêmes cellules.

Pour cela l'expression de la protéine HuR a été diminuée par siRNAs dans les cellules HuH7 et les ARNm qui présentaient une variation de leur niveau d'expression, par comparaison à une condition contrôle, ont été identifiés sur puces Affymetrix HG-U133 Plus 2.0. Ainsi le croisement de ces données avec celles obtenues par Rip-Chip, devrait permettre d'obtenir une liste robuste de transcrits régulés directement par HuR.

1. Diminution de l'expression d'HuR par ARN interférence

Dans un premier temps, une cinétique d'expression de la protéine HuR a été réalisée à partir du 2^{ème} jour après transfection des cellules avec un mélange de 3 siRNAs dirigés contre l'ARNm d'HuR (**Figure 24**).

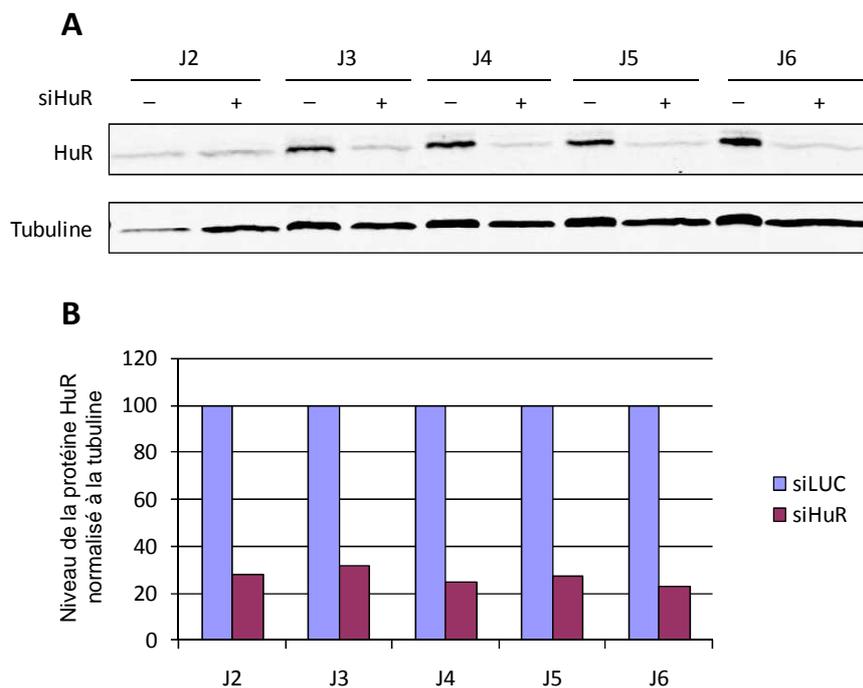


Figure 24 : Cinétique du niveau de la protéine HuR après transfection des cellules HuH7 par siRNAs dirigés contre l'ARNm d'HuR (siHuR) et siRNA contrôle (siLUC). A : western-blot réalisé avec des anticorps dirigés contre la protéine HuR et la tubuline sur 10µg d'extrait protéique total. B : quantification du niveau d'expression de la protéine HuR normalisée au niveau d'expression de la tubuline.

Le niveau de la protéine HuR après transfection est similaire de J2 à J6 avec environ 73% de baisse. Comme HuR peut agir sur la stabilité et donc la demi-vie des ARNm, nous avons décidé de nous placer dans des conditions où la protéine est éteinte depuis suffisamment longtemps, c'est-à-dire à J4 après transfection, afin d'obtenir des effets suffisamment importants sur l'expression des ARNm.

L'expérience de transfection a été réalisée 4 fois, les ARNm ont été purifiés à J4 après transfection et le niveau d'expression de la protéine HuR a été vérifié (**Figure 25**). Sur les 4 expériences, le niveau d'extinction de la protéine est en moyenne de 88%.

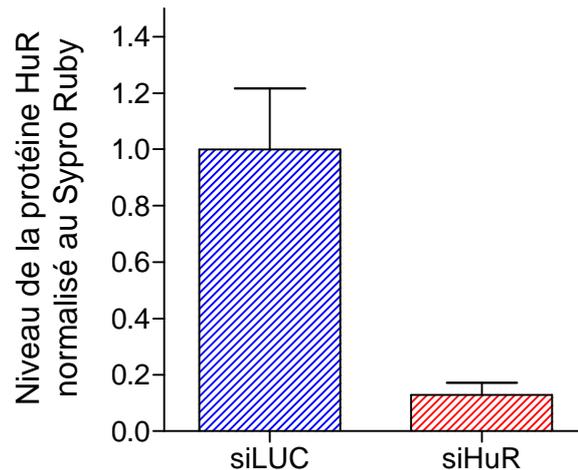


Figure 25 : Vérification de la diminution du niveau de la protéine HuR à J4 après transfection par siRNAs (n=4).

2. *Analyse transcriptomique des ARNm régulés par HuR*

a) *Analyse globale*

Les ARNm extraits à partir des cellules HuH7 traitées avec les siHuR ou le siRNA contrôle (siLUC) ont été analysés sur puces Affymetrix HG-U133 Plus 2.0. L'analyse différentielle des transcrits entre la condition contrôle et la condition test sur les quatre expériences, après traitement statistique, a permis d'identifier environ 14000 sondes (sachant que plusieurs sondes peuvent caractériser une même cibles ou gènes) dont l'expression est significativement modifiée (**Figure 26**).

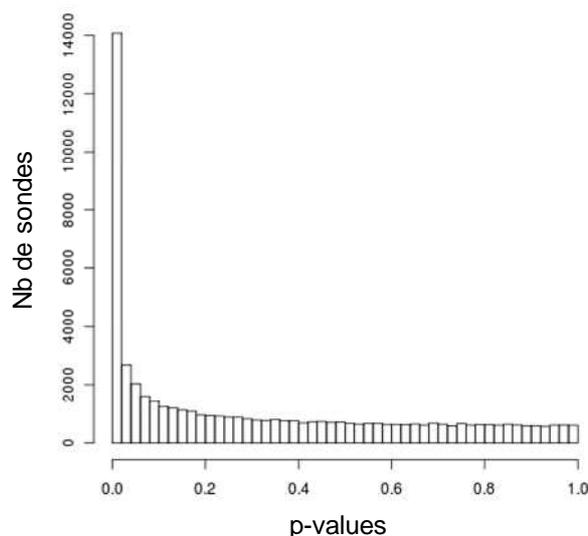


Figure 26 : Représentation graphique du nombre de sondes Affymetrix rangées par p-value après comparaison entre siLUC et siHuR (n=4) par analyse SAM (Significance Analysis Microarrays).

Il est important de noter que toutes les sondes spécifiques du transcrit HuR sont sous exprimées d'un facteur moyen de 4,6 fois. Parmi les gènes influencés par une diminution d'expression d'HuR et déjà décrits dans la littérature, on retrouve les cyclines D1 (-1,8x), A2 (-1,2x) et B1 (1,1x), le facteur de croissance VEGF (-1,3x) ou encore les facteurs MDM2 (-1,1x) et uPA (-1,4x). De façon inexplicée, certains gènes comme PTMA (+1,4x), p27 (+1,4x) ou encore la cycline E1 (+1,1x) sont également présents dans notre liste mais avec une variation d'expression contraire à celle décrite dans la littérature.

Pour la suite de l'étude, seules les sondes qui présentent une variation d'au moins un facteur 2, à la hausse ou à la baisse, par rapport à la condition contrôle seront prises en compte. Ainsi, 447 sondes sont spécifiquement influencées par l'extinction d'HuR, avec 146 sondes surexprimées qui correspondent aux transcrits régulés de façon négative par HuR et 301 sondes sous exprimées qui correspondent aux transcrits régulés de façon positive par HuR (voir annexe 2). Il est intéressant de noter que 2 fois plus de sondes sont régulées positivement par HuR, ce qui confirme le rôle plutôt stabilisateur d'HuR souvent décrit dans la littérature.

b) Analyse ontologique

L'analyse ontologique des 447 sondes a été effectuée par le logiciel DAVID v6.7 afin de faire ressortir les fonctions moléculaires des transcrits régulés par HuR (*Figure 27*) ainsi que les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (*Figure 28*).

Category	Term	Count	%	PValue
MF00261	Actin binding cytoskeletal protein	19	5,7	5,29E-05
MF00020	Peptide hormone	8	2,4	1,65E-03
MF00127	Reductase	10	3,0	2,44E-03
MF00019	Growth factor	7	2,1	1,85E-02
MF00091	Cytoskeletal protein	23	6,9	2,10E-02
MF00292	Other enzyme inhibitor	3	0,9	2,18E-02
MF00219	Annexin	5	1,5	3,34E-02
MF00016	Signaling molecule	21	6,3	4,34E-02
MF00102	Protease inhibitor	6	1,8	6,60E-02
MF00123	Oxidoreductase	16	4,8	7,55E-02
MF00126	Dehydrogenase	8	2,4	8,01E-02
MF00251	Other protease inhibitor	2	0,6	8,63E-02
MF00087	Transfer/carrier protein	10	3,0	9,75E-02

Figure 27 : Classification des différentes fonctions moléculaires (MF) des ARNm régulés par HuR. L'analyse a été réalisée sur les transcrits enrichis d'au moins un facteur 2 soit un total de 447 sondes. Après interrogation des banques de données à l'aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sur les 447 cibles proposées, 332 correspondent à des gènes annotés par le programme. En utilisant les paramètres d'analyse suivants : count ≥ 2 et p-value $\leq 0,1$; 258 gènes sur les 332 analysés n'ont pas pu être classés dans une fonction moléculaire particulière. La colonne « count » représente le nombre de gènes retrouvés dans la fonction moléculaire concernée, la colonne « % » représente le pourcentage de gènes impliqués dans la fonction par rapport au nombre total de gènes ayant servis à l'analyse (soit 332). Les différentes fonctions ont été classées en fonction de leur significativité par p-value croissante.

Parmi les ARNm régulés par HuR, on trouve beaucoup de transcrits codant pour des protéines du cytosquelette. On retrouve aussi un fort enrichissement en enzymes impliquées dans le métabolisme et le transport des lipides ainsi que les mécanismes de l'angiogénèse et le métabolisme du sang (*Figure 28*).

Category	Term	Count	%	PValue
BP00209	Blood circulation and gas exchange	7	2,1	3,99E-03
BP00028	Lipid and fatty acid transport	8	2,4	6,56E-03
BP00019	Lipid, fatty acid and steroid metabolism	24	7,2	6,86E-03
BP00173	Muscle contraction	9	2,7	1,85E-02
BP00176	Blood clotting	6	1,8	2,32E-02
BP00141	Transport	33	9,9	2,71E-02
BP00069	Protein disulfide-isomerase reaction	3	0,9	3,92E-02
BP00013	Amino acid metabolism	9	2,7	4,97E-02
BP00129	Endocytosis	10	3,0	5,31E-02
BP00126	Exocytosis	7	2,1	6,19E-02
BP00267	Homeostasis	8	2,4	6,21E-02
BP00223	Angiogenesis	4	1,2	7,26E-02

Figure 28 : Classification des différents processus biologiques (BP) dans lesquels les ARNm régulés par HuR sont représentés. L'analyse a été réalisée sur les transcrits enrichis d'au moins un facteur 2 soit un total de 447 sondes. Après interrogation des banques de données à l'aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sur les 447 cibles proposées, 332 correspondent à des gènes annotés. En utilisant les paramètres d'analyse suivants : count ≥ 2 et p-value $\leq 0,1$; 247 gènes sur les 332 analysés n'ont pas pu être classés dans un processus biologique particulier. La colonne « count » représente le nombre de gènes retrouvés dans le processus biologique concerné, la colonne « % » représente le pourcentage de gènes impliqués dans le processus par rapport au nombre total de gènes ayant servis à l'analyse (soit 332). Les différents processus biologiques ont été classés en fonction de leur significativité : par p-value croissante.

C. Croisement des données transcriptomiques

La liste des transcrits cibles de la protéine HuR dans les cellules HuH7 (1349 sondes) a été croisée avec la liste des ARNm dont l'expression variait en condition d'extinction d'HuR dans ces mêmes cellules (447 sondes). Avec les seuils utilisés, c'est-à-dire une variation d'au moins un facteur 2 dans les expériences de siHUR et un enrichissement supérieur ou égal à 3 dans les expériences de RIP-Chip, 36 sondes, soit 24 gènes annotés, sont communes aux 2 listes (*Figure 29*).

Probe Set ID	Gene Symbol	FC siHuR/siLUC	FC RIP-Chip	Gene Title	Entrez Gene
218683_at	PTBP2	3,0	3,3	polypyrimidine tract binding protein 2	58155
232165_at	EPPK1	2,8	13,7	epiplakin 1	83481
232164_s_at	EPPK1	2,6	13,6	epiplakin 1	83481
239678_at	---	2,5	3,3	---	---
1552612_at	CDC42SE2	2,4	3,7	CDC42 small effector 2	56990
1552613_s_at	CDC42SE2	2,3	5,1	CDC42 small effector 2	56990
205184_at	GNG4	2,2	7,3	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	2786
201537_s_at	DUSP3	2,1	3,4	dual specificity phosphatase 3	1845
212063_at	CD44	2,1	4,0	CD44 molecule (Indian blood group)	960
1555765_a_at	GNG4	2,1	4,5	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	2786
91816_f_at	MEX3D	2,0	24,6	mex-3 homolog D (C. elegans)	399664
201110_s_at	THBS1	2,0	4,7	thrombospondin 1	7057
217996_at	PHLDA1	2,0	7,1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	22822
215440_s_at	BEX4	-2,0	5,1	brain expressed, X-linked 4	56271
242149_at	C18orf19	-2,0	3,7	chromosome 18 open reading frame 19	125228
223588_at	THAP2	-2,0	4,5	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2	83591
228033_at	E2F7	-2,0	3,8	E2F transcription factor 7	144455
212417_at	SCAMP1	-2,1	8,5	secretory carrier membrane protein 1	9522
230630_at	---	-2,1	3,5	---	---
213906_at	MYBL1	-2,1	3,6	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	4603
225911_at	NPNT	-2,1	3,1	nephronectin	255743
239252_at	---	-2,2	6,6	---	---
229656_s_at	EML6	-2,2	3,1	echinoderm microtubule associated protein like 6	400954
201313_at	ENO2	-2,2	5,6	enolase 2 (gamma, neuronal)	2026
202708_s_at	HIST2H2BE	-2,4	15,6	histone cluster 2, H2be	8349
228603_at	---	-2,4	3,8	---	---
206363_at	MAF	-2,4	5,1	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	4094
213435_at	SATB2	-2,5	4,0	SATB homeobox 2	23314
231311_at	---	-2,5	3,2	---	---
229327_s_at	---	-3,1	7,9	---	---
228750_at	---	-3,3	3,2	---	---
230534_at	ZNF678	-3,4	8,1	zinc finger protein 678	339500
201726_at	ELAVL1	-3,8	5,9	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	1994
218559_s_at	MAFB	-4,2	4,3	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	9935
227746_at	ELAVL1	-4,5	5,0	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	1994
244660_at	ELAVL1	-5,1	3,4	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	1994

Figure 29 : Tableau récapitulant le nom et les caractéristiques des gènes régulés par la protéine HuR dans les cellules HuH7. Le signe "-" représente une baisse du taux d'ARNm. Fc : "Fold change" ou variation d'expression.

L'analyse ontologique de ces 36 sondes nous révèle que parmi les ARNm régulés par la protéine HuR de nombreux facteurs de liaison à l'ARN ainsi que des facteurs de transcription sont retrouvés (*Figure 30 A*). De plus, il est intéressant de noter que ces facteurs de transcription sont pour la plupart régulés positivement par HuR et participent à la prolifération et à la différenciation cellulaire (*Figure 30 B*), qui sont des mécanismes importants pour la progression tumorale.

A

Category	Term	Count	%	PValue	Genes
MF00039	Other transcription factor	5	18,5	9,94E-04	E2F7, SATB2, MAF, MAFB, MYBL1
MF00042	Nucleic acid binding	9	33,3	9,73E-03	E2F7, SATB2, MAF, MAFB, MYBL1, ELAVL1, THAP2, MEX3D, PTBP2

B

Category	Term	Count	%	PValue	Genes
BP00031	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	8	29,6	4,04E-02	E2F7, SATB2, MAF, MAFB, MYBL1, ELAVL1, THAP2, PTBP2
BP00224	Cell proliferation and differentiation	5	18,5	4,07E-02	E2F7, MAF, MAFB, MYBL1, ELAVL1

Figure 30 : Analyse ontologique des 36 sondes régulées par la protéine HuR. Après interrogation des banques de données à l'aide du programme DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sur les 36 sondes proposées, 27 correspondent à des gènes annotés. A : analyse de la fonction moléculaire (MF) et B : analyse des processus biologiques (BP) des 27 gènes.

D. Extrapolation des données cellulaires à la pathologie humaine

Après analyse des données transcriptomiques publiées par l'équipe du Pr Jessica Zucman-Rossi, 547 sondes dont le signal variait d'un facteur 2 ou plus dans les tissus tumoraux de CHC par rapport aux tissus contrôles non tumoraux ont pu être identifiées. Parmi ces 547 sondes, 93 sont surexprimées dans le CHC et 454 sont sous-exprimées. Finalement, les données obtenues précédemment dans la lignée cellulaire de CHC HuH7 ont été confrontées à cette liste (**Figure 31**).

n=14

Sondes	Gènes	Fc CHC	Fc IP HuR
209220_at	GPC3	8,4	3,1
202723_s_at	FOXO1	-2,0	5,1
210959_s_at	SRD5A1	-2,1	3,5
49452_at	ACACB	-2,1	8,2
215498_s_at	MAP2K3	-2,2	6,1
221059_s_at	COTL1	-2,2	4,0
206643_at	HAL	-2,2	3,3
209723_at	SERPINB9	-2,4	3,9
201110_s_at	THBS1	-2,4	4,7
217996_at	PHLDA1	-3,6	7,1
202409_at	IGF2 /// INS-IGF2	-5,2	19,6
206754_s_at	CYP2B6 /// CYP2B7P1	-5,7	4,9
206755_at	CYP2B6	-6,5	4,0
204326_x_at	MT1X	-6,8	4,3

n=2

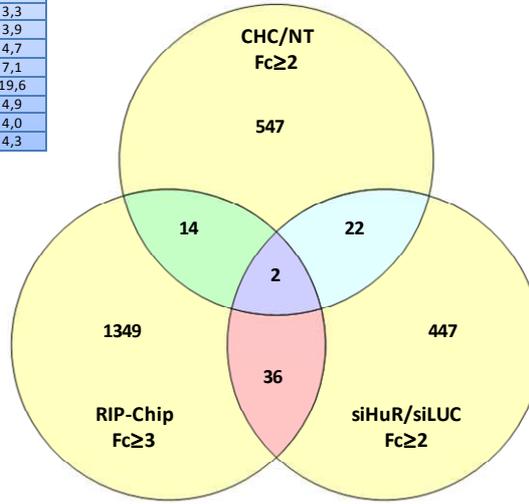
Sondes	Gènes	Fc CHC	Fc IP HuR	Fc siHuR
201110_s_at	THBS1	-2,4	4,7	2,0
217996_at	PHLDA1	-3,6	7,1	2,0

n=36

Sondes	Gènes	Fc siHuR	Fc IP HuR
218683_at	PTBP2	3,0	3,3
232165_at	EPPK1	2,8	13,7
232164_s_at	EPPK1	2,6	13,6
239678_at	---	2,5	3,3
1552612_at	CDC42SE2	2,4	3,7
1552613_s_at	CDC42SE2	2,3	5,1
205184_at	GNG4	2,2	7,3
201537_s_at	DUSP3	2,1	3,4
212063_at	CD44	2,1	4,0
1555765_a_at	GNG4	2,1	4,5
91816_f_at	MEX3D	2,0	24,6
201110_s_at	THBS1	2,0	4,7
217996_at	PHLDA1	2,0	7,1
215440_s_at	BEX4	-2,0	5,1
242149_at	C18orf19	-2,0	3,7
223588_at	THAP2	-2,0	4,5
228033_at	E2F7	-2,0	3,8
212417_at	SCAMP1	-2,1	8,5
230630_at	---	-2,1	3,5
213906_at	MYBL1	-2,1	3,6
225911_at	NPNT	-2,1	3,1
239252_at	---	-2,2	6,6
229656_s_at	EML6	-2,2	3,1
201313_at	ENO2	-2,2	5,6
202708_s_at	HIST2H2BE	-2,4	15,6
228603_at	---	-2,4	3,8
206363_at	MAF	-2,4	5,1
213435_at	SATB2	-2,5	4,0
231311_at	---	-2,5	3,2
229327_s_at	---	-3,1	7,9
228750_at	---	-3,3	3,2
230534_at	ZNF678	-3,4	8,1
201726_at	ELAVL1	-3,8	5,9
218559_s_at	MAFB	-4,2	4,3
227746_at	ELAVL1	-4,5	5,0
244660_at	ELAVL1	-5,1	3,4

n=22

Sondes	Gènes	Fc siHuR	Fc CHC
203373_at	SOCS2	4,8	-2,9
203372_s_at	SOCS2	4,4	-2,5
205141_at	ANG	2,8	-2,1
217546_at	MT1M	2,6	-24,1
205547_s_at	TAGLN	2,5	-2,2
218424_s_at	STEAP3	2,2	-2,4
201110_s_at	THBS1	2,0	-2,4
217996_at	PHLDA1	2,0	-3,6
39248_at	AQP3	-8,7	-2,6
219410_at	TMEM45A	-3,5	-4,6
205939_at	CYP3A7	-3,4	-2,7
211843_x_at	CYP3A7	-3,1	-2,4
205892_s_at	FABP1	-2,7	-3,6
205844_at	VNN1	-2,6	-5,8
209978_s_at	LPA /// PLG	-2,5	-2,4
217073_x_at	APOA1	-2,5	-2,5
204450_x_at	APOA1	-2,4	-2,5
209977_at	PLG	-2,3	-2,2
205999_x_at	CYP3A4	-2,2	-4,4
220491_at	HAMP	-2,2	-28,3
205498_at	GHR	-2,1	-5,1
206177_s_at	ARG1	-2,1	-2,5



NT: tissu non tumoral
 CHC: tissu tumoral de CHC
 Fc CHC/NT: variation d'expression dans le CHC/NT
 Fc siHuR/siLUC: variation d'expression dans les HuH7 traitées avec le siRNA HuR/siRNA contrôle
 Fc RIP-Chip: variation d'expression dans le RNA-Chip HuR/Anticorps contrôle

Figure 31 : Diagramme de Venne représentant les sondes communes aux 3 études transcriptomiques.

Vingt-deux sondes sont communes aux listes « CHC/NT » et « siHUR » soulignant ainsi des ARNm potentiellement régulés par HuR et dérégulés dans le CHC. Parmi les ARNm représentés par ces 22 sondes, il est intéressant de noter que tous sont sous-exprimés dans le CHC. Si l'on s'intéresse de plus près à ces 22 sondes, 8 d'entre elles sont régulées négativement par HuR (elles présentent une surexpression lorsque HuR est diminuée) et ces sondes sont sous-exprimées dans le CHC : la sous-expression de ces sondes dans le CHC pourrait donc s'expliquer en partie ou en totalité par la surexpression d'HuR. Quatorze sondes sont régulées positivement par HuR (elles présentent une sous-expression lorsque HuR est diminuée), mais sont retrouvées à la baisse dans le CHC. La surexpression d'HuR dans le CHC ne peut rendre compte *per se* de la différence d'expression de ces gènes.

La comparaison entre la liste « CHC/NT » et « RIP-Chip » nous apprend que 14 transcrits, capables d'interagir avec HuR, sont dérégulés dans le CHC. Il est

intéressant de noter que parmi ces 14 transcrits, un seul présente une surexpression dans le CHC, le GPC3.

Finalement, le croisement de ces 3 listes nous a permis d'identifier les ARNm ayant les caractéristiques suivantes : une expression diminuée au moins d'un facteur 2 dans le CHC par rapport au tissu péri-tumoral, une interaction de l'ARNm avec la protéine HuR dans les cellules HuH7 et une expression augmentée au moins 2 fois dans les cellules HuH7 sous-exprimant HuR par rapport aux cellules contrôles. Ces analyses nous ont permis d'aboutir à la sélection de 2 sondes communes à ces 3 listes, l'une correspondant à l'ARNm de THBS1 (thrombospondine-1) et l'autre à l'ARNm de PHLDA1 (Pleckstrin homology-like domain family A member 1).

Ces résultats suggèrent que la protéine HuR interagit avec les ARNm de ces gènes et régule leur expression au niveau post-transcriptionnel en réduisant la stabilité de leur ARNm.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré, par western-blot, que la quantité de protéine HuR est augmentée dans le CHC par l'étude comparative et quantitative du niveau de la protéine d'une part dans des lignées cellulaires issues de CHC, et d'autre part entre des tissus tumoraux et des tissus péri-tumoraux provenant de 27 patients atteints de CHC. Parmi les patients, 89% surexpriment HuR, et la moyenne de surexpression est de 2,2 fois. Cette analyse quantitative a été complétée par une analyse qualitative sur ces mêmes patients, réalisée par marquage immunohistochimique de la protéine. Toutes ces données confirment des résultats récents (Vazquez-Chantada, Fernandez-Ramos et al. 2010), où les auteurs ont mis en évidence par immunofluorescence une augmentation du niveau protéique d'environ 5 fois chez 22 patients atteints de CHC. Bien que les chiffres soient différents (ce qui peut s'expliquer par les méthodes d'analyses qui sont différentes) tous ces résultats permettent de conclure que la protéine HuR présente un taux anormalement élevée dans le tissu tumoral hépatique.

Après avoir montré chez 19 patients que les niveaux d'HuR en ARNm et en protéine étaient corrélés, nous avons pu étendre notre étude à l'analyse transcriptomique de 57 CHC réalisée dans l'équipe INSERM U674 de l'Université Paris 7 dirigée par le Pr Jessica Zucman-Rossi. Ceci nous a permis d'une part de confirmer la surexpression d'HuR et d'autre part de rechercher une ou plusieurs corrélations entre l'expression d'HuR et les données clinico-pathologiques de ces 57 patients. Nous avons pu corréler un fort niveau d'expression d'HuR avec des tumeurs associées à une infection virale par l'hépatite B, présentant une forte instabilité chromosomique, une prolifération cellulaire accrue, une activation de la voie AKT (impliquée dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse) et un pronostic défavorable en termes de survie pour les patients. De façon intéressante, une étude récente a montré que HuR pouvait être un médiateur de la voie PI3K/AKT pour la régulation post-transcriptionnelle de DNMT3B (DNA Méthyltransferase 3B) montrant ainsi une interconnexion entre cette voie et la protéine HuR (Mei, Sun et al. 2010). En collaboration avec l'équipe du Pr Jessica Zucman-Rossi, la recherche de corrélations entre le niveau d'HuR et les données clinico-pathologiques sur 200 nouveaux patients est en cours d'analyse. A terme, l'objectif sera de savoir si HuR

peut être considéré comme facteur pronostique pour les patients atteints de CHC, comme cela a déjà été proposé pour d'autres cancers.

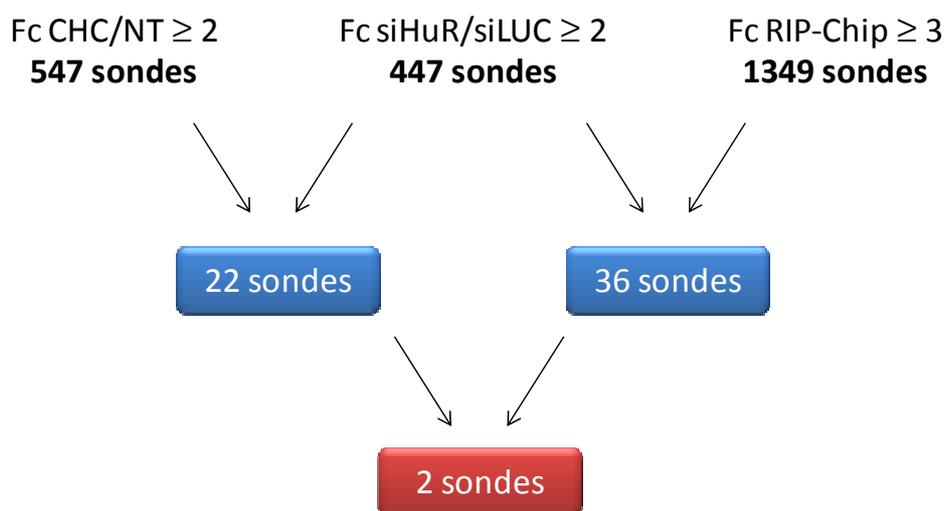
Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons recherché les cibles ARNm fixés par la protéine HuR dans la lignée cellulaire HuH7 de CHC. Cette recherche a été réalisée en identifiant sur puces à ADN les ARNm co-précipités avec la protéine HuR. Après traitement statistique, 1349 sondes enrichies d'au moins un facteur 3 dans l'IP HuR par rapport à l'IP contrôle ont pu être identifiées. Cependant, sur les 4 Co-IP réalisées seules 2 expériences ont pu être analysées sur puces à ADN. C'est pourquoi d'autres Co-IP sont en cours de réalisation afin de compléter cette analyse. Après avoir confronté nos résultats aux données de la littérature, certaines cibles d'HuR déjà décrites dans la littérature ont été retrouvées, comme par exemple les ARNm CCND1, eIF4E, PTMA. Néanmoins comme nous avons pu le voir, la population d'ARNm fixée par HuR reste dépendante de la lignée cellulaire dans laquelle l'étude a été réalisée. De façon intéressante, l'analyse ontologique des cibles d'HuR révèle que de nombreuses cibles sont connues pour participer dans des voies cellulaires pro-oncogéniques impliquées dans de multiples cancers.

Ensuite, en diminuant le niveau protéique d'HuR par ARN interférence dans la lignée cellulaire HuH7, nous avons identifié par une analyse transcriptomique 447 sondes dont l'expression variait d'au moins un facteur 2. Parmi ces sondes, 146 sont régulées de façon négative et 301 sont régulées de façon positive par HuR, ce qui va dans le sens du rôle stabilisateur de la protéine HuR, majoritairement décrit dans la littérature. De nombreux transcrits codant pour des protéines du cytosquelette ainsi que des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides sont présents dans cette liste.

Le croisement de ces données nous a permis d'établir une liste des transcrits qui seraient directement régulés par la protéine HuR dans la lignée HuH7. Ainsi nous avons pu identifier 36 sondes soit 24 gènes annotés. Au sein de cette liste nous avons noté la présence de nombreux facteurs de transcription, impliqués pour la plupart dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Dans cette liste obtenue *in cellulo*, nous avons cherché à identifier des candidats qui ont une pertinence dans le CHC, c'est-à-dire dont l'expression est modifiée dans

le tissu tumoral. Pour cela, nos données ont été confrontées aux analyses transcriptomiques réalisées par l'équipe du Pr Jessica Zucman-Rossi (Boyault, Rickman et al. 2007) qui a identifié les transcrits dérégulés dans le CHC.



NT: tissu non tumoral
 CHC: tissu tumoral de CHC
 Fc CHC/NT: variation d'expression dans le CHC/NT
 Fc siHuR/siLUC: variation d'expression dans les HuH7 traitées avec le siRNA HuR/siRNA contrôle
 Fc RIP-Chip: variation d'expression dans le RNA-Chip HuR/Anticorps contrôle

Gène	Protéine	Fc CHC	Fc IP HuR	Fc siHuR
THBS1	Thrombospondin 1	-2,4	4,7	2,0
PHLDA1	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	-3,6	7,1	2,0

Figure 1 : Schéma décrivant la stratégie utilisée pour l'identification des cibles fonctionnelles de la protéine HuR pertinentes dans le CHC.

Ces analyses ont abouti à la sélection de 2 candidats : PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain A member 1) et THBS1 (thrombospondin 1). Ces résultats suggèrent que HuR interagit avec les ARNm de ces gènes et régule leur expression au niveau post-transcriptionnel en réduisant la stabilité de leur ARNm dans le tissu tumoral hépatique. Ce mode de régulation est plutôt original en ce qui concerne la protéine HuR qui est surtout considérée comme un facteur stabilisant les ARNm.

Cependant, une étude a récemment montré des résultats similaires aux nôtres en ce qui concerne l'expression du gène CD9 dans la lignée d'adénocarcinome mammaire MDA-MB-231 (Calaluce, Gubin et al. 2010).

PHLDA1 ou Pleckstrin homology-like domain family A member 1 est connue pour être un facteur pronostique indépendant en terme de survie dans le cancer du sein (Nagai, Fregnani et al. 2007). Effectivement l'ARNm ainsi que la protéine PHLDA1 sont sous-exprimés dans plus de 70% des cas de cancer du sein, et cette sous-expression est corrélée à un mauvais pronostic de survie pour les patients. De plus, au niveau cellulaire la protéine PHLDA1 a été décrite comme un facteur pro-apoptotique (Park, Lee et al. 1996; Neef, Kuske et al. 2002). Tous ces éléments font donc de PHLDA1 un candidat intéressant pour la poursuite de notre investigation du rôle d'HuR dans le CHC.

La thrombospondine 1 (THBS1) est une protéine de la matrice extracellulaire qui intervient dans l'adhésion, l'invasion, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (Sargiannidou, Zhou et al. 2001). En cancérologie, son rôle pro-tumoral (Poon, Chung et al. 2004) ou anti-tumoral (Zhou, Picard et al. 2010) reste controversé ainsi que son expression dans les cancers. Plusieurs études ont analysé par immunohistochimie l'expression de cette protéine dans le CHC (Hayashi, Kurohiji et al. 1997; Poon, Chung et al. 2004). La thrombospondine-1 présente une forte expression dans les cellules stromales (cellules endothéliales et fibroblastes) localisées dans les zones fibreuses, c'est-à-dire les septa fibreux ainsi que le micro-environnement tumoral. La régulation de THBS1 par HuR a déjà été décrite dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Mazan-Mamczarz, Hagner et al. 2008). Les auteurs montrent qu'HuR fixe l'ARNm de THBS1 et contrôle positivement sa traduction. Quand les cellules tendent vers un phénotype plus agressif, HuR se fixe moins sur l'ARNm de THBS1, ce qui entraîne une diminution de son expression. Les auteurs n'ont pas trouvé d'effets notables d'HuR sur le niveau de l'ARNm THBS1. Or, nos données laisseraient penser qu'HuR régulerait THBS1 au niveau de la stabilité de son ARNm. C'est pourquoi, une meilleure compréhension du mécanisme de régulation de THBS1 par HuR dans le CHC permettrait de faire avancer les connaissances sur le rôle de THBS1 en cancérologie.

Finalement, la démonstration d'une régulation négative de ces deux gènes par une élévation d'expression de la protéine HuR pourrait avoir des retombées importantes en carcinogenèse hépatique. Les perspectives de ce travail seront dans un premier temps de confirmer les données transcriptomiques obtenues. Pour cela, l'expression d'HuR sera modulée à la hausse ou la baisse dans différentes lignées cellulaires de CHC et l'expression des ARNm et des protéines PHLDA1 et THBS1 seront mesurées par qRT-PCR et western-blot. Dans un deuxième temps, l'aspect mécanistique de cette régulation sera analysé en cherchant à savoir comment HuR contrôle l'expression de chaque gène candidat au niveau post-transcriptionnel en utilisant des méthodes de mesure de la stabilité et de la capacité de traduction des ARNm. Les séquences de fixation de la protéine HuR sur les ARNm de PHLDA1 et THBS1 seront également recherchées. Enfin, les conséquences de la régulation d'HuR sur ces deux gènes seront examinées par l'analyse des processus cellulaires tels que la motilité, l'adhésion, l'invasion et la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose.

En conclusion, l'ensemble de ces données transcriptomiques, bien que préliminaires pour la compréhension du rôle de la régulation post-transcriptionnelle dans les processus de développement de la carcinogenèse hépatique, nous permet de souligner l'importance de cette régulation dans la progression tumorale. La transition entre une cellule normale et une cellule cancéreuse passe par l'acquisition de nouvelles compétences comme par exemple la résistance à l'apoptose, l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'échappement à la réponse immunitaire conférant un avantage sélectif à ces cellules. L'acquisition de ces nouvelles compétences, caractérisant le phénotype tumoral, se fait par l'activation de voies de signalisation cellulaire importantes telle que la voie PI3K/AKT, impliquée dans la survie cellulaire, la voie RAF/MEK/ERK, impliquée dans la prolifération cellulaire ou encore la voie WNT/ β -caténine, impliquée dans la différenciation cellulaire. L'activation de ces voies passe plus particulièrement par une dérégulation des facteurs qui les composent comme par exemple des mutations activatrices ou

inactivatrices, des modifications post-traductionnelles ou encore un changement d'expression, où la régulation post-transcriptionnelle joue un rôle important.

La protéine HuR, principalement nucléaire, en plus d'une augmentation globale de sa quantité, subit une translocation nucléo-cytoplasmique en condition pathologique. Ainsi, une fois présente dans le cytoplasme, HuR sera capable d'agir sur la stabilité et la capacité de traduction de nombreux ARNm. Grâce aux analyses transcriptomiques réalisées dans cette étude, nous avons pu montrer que la protéine HuR est capable d'agir sur de nombreux facteurs composant les voies pro-tumorales comme la voie Jak-STAT, ErbB, mTOR, p53 et plus particulièrement la voie WNT/ β -caténine. Ainsi la protéine HuR, en modifiant la stabilité ou la capacité de traduction de ces facteurs, peut participer à la mise en place et à l'entretien du phénotype tumoral.

Ainsi, par son large spectre d'action, la protéine HuR pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du CHC. Effectivement, une diminution de cette protéine pourrait affecter de nombreuses voies oncogéniques et ainsi ralentir la progression tumorale. Une étude, réalisée en 2003 par Lopez de Silanes sur le cancer du colon, a montré que des lignées cellulaires humaines de carcinome colorectal (RKO) surexprimant la protéine HuR prolifèrent plus rapidement en culture, et produisent des tumeurs significativement plus larges avec une croissance plus rapide après xénogreffes chez les souris. A l'inverse des cellules RKO où la protéine HuR est diminuée par siARN, se divisent plus lentement en culture et produisent des tumeurs plus petites chez la souris.

D'un point de vue thérapeutique, les applications de l'injection intratumorale de siARN spécifiques de HuR semblent limitées du fait du mode d'administration lui-même. Cependant, une récente étude a permis d'identifier des inhibiteurs de HuR de bas poids moléculaires (Meisner, Hintersteiner et al. 2007). Il s'agit de la déhydromuclatine, du MS-444 et de l'okicénone, des molécules déjà décrites comme des agents anti-tumoraux et qui interfèrent avec la capacité de fixation de la protéine HuR sur ses cibles. Dans le cas de l'utilisation de tels composés chimiques en thérapie, la question de la spécificité et de la toxicité de ces inhibiteurs demeure toujours un problème et nécessitera encore de nombreuses études *in vivo*.

Cependant l'utilisation de ces composés reste une piste intéressante dans les traitements anticancéreux.

La seule diminution du taux de protéine HuR ou l'inhibition de son activité ne sera pas suffisant comme seul traitement du CHC. Néanmoins, le ciblage de la protéine HuR comme stratégie thérapeutique peut s'avérer intéressant associé à un autre traitement tel que l'utilisation du sorafénib. Le sorafénib, inhibiteur de protéines kinases, agit à la fois sur les cellules tumorales par inhibition de la prolifération cellulaire, et sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins en inhibant l'angiogenèse. Ainsi l'effet combiné d'un inhibiteur de la fonction de la protéine HuR, affectant ainsi de nombreuses voies de signalisation tumorales, avec l'utilisation du sorafénib, permettrait d'augmenter le champ d'action de ces molécules et pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante. Il sera cependant nécessaire d'évaluer l'effet cytotoxique quant à l'utilisation simultanée de ces deux types d'inhibiteurs.

ANNEXE 1

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene	FC RIP-Chip
243951_at	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	ABCB1	5243	3,5
226363_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	ABCC5	10057	11,5
221815_at	abhydrolase domain containing 2	ABHD2	11057	4,4
225337_at	abhydrolase domain containing 2	ABHD2	11057	3,6
225098_at	abl-interactor 2	ABI2	10152	4,6
242624_at	actin binding LIM protein family, member 2	ABLIM2	84448	4,4
49452_at	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	ACACB	32	8,2
43427_at	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	ACACB	32	6,0
221928_at	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	ACACB	32	4,0
221669_s_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8	ACAD8	27034	3,9
202982_s_at	acyl-CoA thioesterase 1 / acyl-CoA thioesterase 2	ACOT1 / ACOT2	10965 / 641371	3,9
200727_s_at	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	ACTR2	10097	5,5
200728_at	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	ACTR2	10097	3,5
220028_at	activin A receptor, type IIB	ACVR2B	93	4,6
1558142_at	adenylosuccinate lyase / trinucleotide repeat containing 6B	ADSL / TNRC6B	158 / 23112	7,5
229036_at	adenylosuccinate lyase / trinucleotide repeat containing 6B	ADSL / TNRC6B	158 / 23112	5,8
228998_at	adenylosuccinate lyase / trinucleotide repeat containing 6B	ADSL / TNRC6B	158 / 23112	3,5
224480_s_at	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	AGPAT9	84803	4,4
205401_at	alkylglycerone phosphate synthase	AGPS	8540	4,4
223075_s_at	allograft inflammatory factor 1-like	AIF1L	83543	6,1
204348_s_at	adenylate kinase 3-like 1	AK3L1	205	3,9
221589_s_at	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	ALDH6A1	4329	4,2
234302_s_at	alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)	ALKBH5	54890	5,5
1553101_a_at	alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)	ALKBH5	54890	5,1
232184_at	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)	ALS2	57679	11,9
202203_s_at	autocrine motility factor receptor	AMFR	267	13,1
204976_s_at	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1	AMMECR1	9949	8,4
223297_at	AMME chromosomal region gene 1-like	AMMECR1L	83607	5,6
224687_at	ankyrin repeat and IBR domain containing 1	ANKIB1	54467	3,6
218093_s_at	ankyrin repeat domain 10	ANKRD10	55608	3,7
238642_at	ankyrin repeat domain 13 family, member D	ANKRD13D	338692	8,1
228471_at	ankyrin repeat domain 44	ANKRD44	91526	7,9
235903_at	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6	ANKS6	203286	3,9
201051_at	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	ANP32A	8125	4,0
223624_at	AN1, ubiquitin-like, homolog (Xenopus laevis)	ANUBL1	93550	4,9
207064_s_at	amine oxidase, copper containing 2 (retina-specific)	AOC2	314	3,7
208703_s_at	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	APLP2	334	8,8
208704_x_at	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	APLP2	334	3,4
230652_at	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	ARAF	369	3,5
210603_at	ARD1 homolog B (S. cerevisiae)	ARD1B	84779	7,0
208750_s_at	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	375	3,8
203311_s_at	ADP-ribosylation factor 6	ARF6	382	5,1
225173_at	Rho GTPase activating protein 18	ARHGAP18	93663	4,1
235595_at	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	ARHGEF2	9181	4,9
209435_s_at	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	ARHGEF2	9181	3,3
210649_s_at	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	ARID1A	8289	5,1
225181_at	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	ARID1B	57492	9,1
225184_at	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	ARID1B	57492	3,1
218964_at	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)	ARID3B	10620	3,2
212614_at	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	ARID5B	84159	3,1
200950_at	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa	ARPC1A	10552	3,4
208679_s_at	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	ARPC2	10109	4,3
217817_at	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	ARPC4	10093	7,8
223101_s_at	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	ARPC5L	81873	4,6
206414_s_at	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2	ASAP2	8853	3,3
224524_s_at	ankyrin repeat and SOCS box-containing 3 / G protein-coupled receptor 75 / GPR75-ASB3	ASB3 / GPR75 / LOC100302652	100302652 / 10936 / 51130	3,8
240017_at	Aspartic peptidase, retroviral-like 1	ASPRV1	151516	7,3
212237_at	additional sex combs like 1 (Drosophila)	ASXL1	171023	3,5
1570523_s_at	ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)	ATG10	83734	3,0
232612_s_at	ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)	ATG16L1	55054	6,4
1554557_at	ATPase, class VI, type 11B	ATP11B	23200	4,2
201242_s_at	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	481	5,0
204624_at	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	ATP7B	540	3,2
226771_at	ATPase, class I, type 8B, member 2	ATP8B2	57198	3,5
1554704_at	ATPase, class I, type 8B, member 3	ATP8B3	148229	4,6

203231_s_at	ataxin 1	ATXN1	6310	8,0
242230_at	ataxin 1	ATXN1	6310	3,9
239219_at	aurora kinase B	AURKB	9212	4,6
221485_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	B4GALT5	9334	5,4
202984_s_at	BCL2-associated athanogene 5	BAG5	9529	3,4
205345_at	BRCA1 associated RING domain 1	BARD1	580	11,6
212745_s_at	Bardet-Biedl syndrome 4	BBS4	585	3,1
213016_at	bobby sox homolog (Drosophila)	BBX	56987	5,7
213015_at	bobby sox homolog (Drosophila)	BBX	56987	5,2
223134_at	bobby sox homolog (Drosophila)	BBX	56987	3,7
217657_at	B-cell receptor-associated protein 29	BCAP29	55973	10,6
234979_at	BCDIN3 domain containing	BCDIN3D	144233	4,2
203796_s_at	B-cell CLL/lymphoma 7A	BCL7A	605	3,2
229454_at	BCL2-associated transcription factor 1	BCLAF1	9774	3,3
235155_at	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	BDH2	56898	3,3
227920_at	BEN domain containing 3	BEND3	57673	3,1
215440_s_at	brain expressed, X-linked 4	BEX4	56271	5,1
202094_at	baculoviral IAP repeat-containing 5	BIRC5	332	7,3
210334_x_at	baculoviral IAP repeat-containing 5	BIRC5	332	6,4
202095_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 5	BIRC5	332	3,3
224635_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 6	BIRC6	57448	4,7
233093_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 6	BIRC6	57448	3,3
204832_s_at	bone morphogenetic protein receptor, type IA	BMPRI1A	657	3,9
242579_at	bone morphogenetic protein receptor, type IB	BMPRI1B	658	4,8
214911_s_at	bromodomain containing 2	BRD2	6046	3,8
203825_at	bromodomain containing 3	BRD3	8019	5,5
212547_at	bromodomain containing 3	BRD3	8019	3,0
226054_at	bromodomain containing 4	BRD4	23476	21,8
202102_s_at	bromodomain containing 4	BRD4	23476	8,9
226052_at	bromodomain containing 4	BRD4	23476	3,8
220155_s_at	bromodomain containing 9	BRD9	65980	4,0
200920_s_at	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	BT1	694	3,8
242515_x_at	chromosome 11 open reading frame 17	C11orf17	56672	3,0
220987_s_at	chromosome 11 open reading frame 17 / NUAQ family, SNF1-like kinase, 2	C11orf17 / NUAQ2	56672 / 81788	4,6
218867_s_at	chromosome 12 open reading frame 49	C12orf49	79794	3,7
225887_at	chromosome 13 open reading frame 23	C13orf23	80209	3,8
1552310_at	chromosome 15 open reading frame 40	C15orf40	123207	7,1
223484_at	chromosome 15 open reading frame 48	C15orf48	84419	3,7
230296_at	Chromosome 16 open reading frame 52	C16orf52	730094	3,7
1553400_a_at	chromosome 17 open reading frame 69	C17orf69	147081	5,0
228066_at	chromosome 17 open reading frame 96	C17orf96	100170841	3,2
242149_at	chromosome 18 open reading frame 19	C18orf19	125228	3,7
226406_at	chromosome 18 open reading frame 25	C18orf25	147339	4,1
221988_at	chromosome 19 open reading frame 42	C19orf42	79086	8,4
231901_at	chromosome 19 open reading frame 52	C19orf52	90580	3,6
223124_s_at	chromosome 1 open reading frame 128	C1orf128	57095	4,5
222000_at	chromosome 1 open reading frame 174	C1orf174	339448	3,6
223063_at	chromosome 1 open reading frame 198	C1orf198	84886	3,1
1553741_at	chromosome 1 open reading frame 211	C1orf211	148645	5,3
218914_at	chromosome 1 open reading frame 66	C1orf66	51093	4,5
225551_at	chromosome 1 open reading frame 71	C1orf71	163882	5,0
1558692_at	chromosome 1 open reading frame 85	C1orf85	112770	5,5
1558693_s_at	chromosome 1 open reading frame 85	C1orf85	112770	4,8
218448_at	chromosome 20 open reading frame 11	C20orf11	54994	4,3
219004_s_at	chromosome 21 open reading frame 45	C21orf45	54069	7,6
225695_at	chromosome 2 open reading frame 18	C2orf18	54978	3,2
219617_at	chromosome 2 open reading frame 34	C2orf34	79823	5,7
219474_at	chromosome 3 open reading frame 52	C3orf52	79669	3,3
235562_at	chromosome 3 open reading frame 70	C3orf70	285382	3,0
220891_at	chromosome 4 open reading frame 23	C4orf23	152992	5,7
212923_s_at	chromosome 6 open reading frame 145	C6orf145	221749	7,0
222309_at	Chromosome 6 open reading frame 62	C6orf62	81688	3,2
218784_s_at	chromosome 6 open reading frame 64	C6orf64	55776	5,2
218008_at	chromosome 7 open reading frame 42	C7orf42	55069	9,8
224688_at	chromosome 7 open reading frame 42	C7orf42	55069	3,8
209445_x_at	chromosome 7 open reading frame 44	C7orf44	55744	3,7
228600_x_at	chromosome 7 open reading frame 46	C7orf46	340277	6,7
227443_at	chromosome 9 open reading frame 150	C9orf150	286343	4,6

1555841_at	chromosome 9 open reading frame 30	C9orf30	91283	5,6
221865_at	chromosome 9 open reading frame 91	C9orf91	203197	4,6
211985_s_at	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	CALM1	801	5,2
200935_at	calreticulin	CALR	811	5,2
224994_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	CAMK2D	817	8,5
231793_s_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	CAMK2D	817	4,5
225693_s_at	calmodulin binding transcription activator 1	CAMTA1	23261	6,3
225692_at	calmodulin binding transcription activator 1	CAMTA1	23261	4,7
1554479_a_at	caspase recruitment domain family, member 8	CARD8	22900	5,0
217940_s_at	carbohydrate kinase domain containing	CARKD	55739	5,6
238699_s_at	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	CASK	8573	3,9
205467_at	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP10	843	11,5
209811_at	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP2	835	4,6
226032_at	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP2	835	4,3
213373_s_at	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	841	3,2
202370_s_at	core-binding factor, beta subunit	CBFB	865	3,2
209682_at	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	CBLB	868	5,2
1560220_a_at	chibby homolog 1 (Drosophila)	CBY1	25776	3,0
225320_at	coiled-coil domain containing 109A	CCDC109A	90550	3,1
222890_at	coiled-coil domain containing 113	CCDC113	29070	3,0
224946_s_at	coiled-coil domain containing 115	CCDC115	84317	4,0
207045_at	coiled-coil domain containing 132	CCDC132	55610	6,6
225010_at	coiled-coil domain containing 6	CCDC6	8030	11,0
227451_s_at	Coiled-coil domain containing 90A	CCDC90A	63933	3,9
208711_s_at	cyclin D1	CCND1	595	4,2
208656_s_at	cyclin I	CCNI	10983	4,9
224651_at	cyclin Y	CCNY	219771	34,7
224652_at	cyclin Y	CCNY	219771	4,4
212063_at	CD44 molecule (Indian blood group)	CD44	960	4,0
226016_at	CD47 molecule	CD47	961	6,2
201005_at	CD9 molecule	CD9	928	21,2
1555772_a_at	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	CDC25A	993	14,7
204696_s_at	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	CDC25A	993	3,3
208727_s_at	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42	998	3,7
226400_at	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42	998	3,6
229120_s_at	CDC42 small effector 1	CDC42SE1	56882	9,4
218157_x_at	CDC42 small effector 1	CDC42SE1	56882	7,9
1552613_s_at	CDC42 small effector 2	CDC42SE2	56990	5,1
1552612_at	CDC42 small effector 2	CDC42SE2	56990	3,7
218399_s_at	cell division cycle associated 4	CDCA4	55038	3,1
236023_at	cyclin-dependent kinase 9	CDK9	1025	3,8
214877_at	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	CDKAL1	54901	3,8
235006_at	CDKN2A interacting protein N-terminal like	CDKN2AIPNL	91368	3,1
213230_at	cerebellar degeneration-related protein 2-like	CDR2L	30850	3,7
212862_at	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	CDS2	8760	5,3
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	1051	6,6
207590_s_at	centromere protein I	CENPI	2491	3,1
212746_s_at	centrosomal protein 170kDa	CEP170	9859	3,4
203491_s_at	centrosomal protein 57kDa	CEP57	9702	6,4
219375_at	choline/ethanolamine phosphotransferase 1	CEPT1	10390	3,2
237367_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837	3,1
219492_at	cysteine-rich hydrophobic domain 2	CHIC2	26511	4,1
222786_at	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12	CHST12	55501	3,2
209834_at	carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3	CHST3	9469	3,6
200811_at	cold inducible RNA binding protein	CIRBP	1153	5,4
200998_s_at	cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4	10970	18,4
219161_s_at	chemokine-like factor	CKLF	51192	7,7
226273_at	chloride channel 5	CLCN5	1184	4,2
228335_at	claudin 11	CLDN11	5010	4,2
225759_x_at	calmin (calponin-like, transmembrane)	CLMN	79789	4,2
213839_at	calmin (calponin-like, transmembrane)	CLMN	79789	3,8
1560434_x_at	clathrin, light chain (Lca)	CLTA	1211	3,9
223993_s_at	cornichon homolog 4 (Drosophila)	CNIH4	29097	5,2
201605_x_at	calponin 2	CNN2	1265	3,4
201445_at	calponin 3, acidic	CNN3	1266	8,5
229143_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	CNOT3	4849	3,4
208912_s_at	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	CNP	1267	4,6
1556389_at	canopy 3 homolog (zebrafish)	CNPY3	10695	19,1

239989_at	centlein, centrosomal protein	CNTLN	54875	3,2
219300_s_at	contactin associated protein-like 2	CNTNAP2	26047	4,3
204320_at	collagen, type XI, alpha 1	COL11A1	1301	4,0
37892_at	collagen, type XI, alpha 1	COL11A1	1301	3,1
217749_at	coatamer protein complex, subunit gamma	COPG	22820	5,0
209745_at	coenzyme Q7 homolog, ubiquinone (yeast)	COQ7	10229	4,1
227177_at	coronin, actin binding protein, 2A	CORO2A	7464	3,0
224583_at	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	COTL1	23406	5,1
221059_s_at	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	COTL1	23406	4,0
235855_at	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	COX15	1355	3,4
223281_s_at	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	COX15	1355	3,3
224828_at	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	CPEB4	80315	4,7
224829_at	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	CPEB4	80315	3,6
225129_at	copine II	CPNE2	221184	4,4
210687_at	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	CPT1A	1374	3,7
209833_at	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	8738	3,7
202160_at	CREB binding protein	CREBBP	1387	3,7
202979_s_at	CREB/ATF bZIP transcription factor	CREBZF	58487	5,2
237502_at	Cardiolipin synthase 1	CRLS1	54675	3,4
202329_at	c-src tyrosine kinase	CSK	1445	4,6
240221_at	Casein kinase 1, alpha 1	CSNK1A1	1452	7,2
225756_at	casein kinase 1, epsilon	CSNK1E	1454	6,8
202332_at	casein kinase 1, epsilon	CSNK1E	1454	3,9
224922_at	casein kinase 2, alpha prime polypeptide	CSNK2A2	1459	3,8
229666_s_at	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa	CSTF3	1479	3,8
203392_s_at	C-terminal binding protein 1	CTBP1	1487	8,0
213980_s_at	C-terminal binding protein 1	CTBP1	1487	3,1
212863_x_at	C-terminal binding protein 1	CTBP1	1487	3,0
221742_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	CUGBP1	10658	8,3
209489_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	CUGBP1	10658	4,0
204113_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	CUGBP1	10658	3,5
214743_at	cut-like homeobox 1	CUX1	1523	6,9
223454_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	CXCL16	58191	4,4
244546_at	cytochrome c, somatic	CYCS	54205	5,6
221905_at	cylindromatosis (turban tumor syndrome)	CYLD	1540	3,2
206755_at	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	CYP2B6	1555	4,0
206754_s_at	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6 / cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1	CYP2B6 / CYP2B7P1	1555 / 1556	4,9
228391_at	cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2	CYP4V2	285440	3,2
228900_at	cytospin B	CYTSB	92521	3,9
216060_s_at	dishevelled associated activator of morphogenesis 1	DAAM1	23002	3,8
201280_s_at	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	1601	4,4
205417_s_at	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	DAG1	1605	3,2
203139_at	death-associated protein kinase 1	DAPK1	1612	3,6
224522_s_at	dephospho-CoA kinase domain containing	DCAKD	79877	6,7
222679_s_at	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae)	DCUN1D1	54165	3,7
239648_at	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 3 (S. cerevisiae)	DCUN1D3	123879	3,4
208719_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	10521	3,6
205763_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	DDX18	8886	13,8
221886_at	DENN/MADD domain containing 2A	DENND2A	27147	5,0
212561_at	DENN/MADD domain containing 5A	DENND5A	23258	5,3
218172_s_at	Der1-like domain family, member 1	DERL1	79139	3,4
206752_s_at	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)	DFFB	1677	12,8
218547_at	dehydrololichyl diphosphate synthase	DHDDS	79947	3,8
239093_at	dihydrodipicolinate synthase-like, mitochondrial	DHDPSL	112817	8,9
213631_x_at	dihydroorotate dehydrogenase	DHODH	1723	5,9
213279_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	DHRS1	115817	3,3
202481_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	DHRS3	9249	4,7
223138_s_at	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	DHX36	170506	5,4
227079_at	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8	DHX8	1659	5,7
213229_at	dicer 1, ribonuclease type III	DICER1	23405	3,5
1555301_a_at	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila)	DIP2A	23181	4,8
1561286_a_at	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila)	DIP2A	23181	3,1
227597_at	DIS3 mitotic control homolog (S. cerevisiae)-like 2	DIS3L2	129563	6,3
220512_at	deleted in liver cancer 1	DLC1	10395	4,4
217208_s_at	discs, large homolog 1 (Drosophila)	DLG1	1739	8,1
209015_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	DNAJB6	10049	3,7
222621_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	DNAJC1	64215	4,8

222620_s_at	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	DNAJC1	64215	4,4
230263_s_at	Dedicator of cytokinesis 5	DOCK5	80005	3,5
225502_at	dedicator of cytokinesis 8	DOCK8	81704	3,7
209691_s_at	docking protein 4	DOK4	55715	4,2
221817_at	dolichyl pyrophosphate phosphatase 1	DOLPP1	57171	7,1
224129_s_at	dpy-30 homolog (C. elegans)	DPY30	84661	4,0
201537_s_at	dual specificity phosphatase 3	DUSP3	1845	3,4
213848_at	dual specificity phosphatase 7	DUSP7	1849	5,5
205348_s_at	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	DYNC111	1780	3,5
207231_at	DAZ interacting protein 3, zinc finger	DZIP3	9666	3,3
228361_at	E2F transcription factor 2	E2F2	1870	3,8
228033_at	E2F transcription factor 7	E2F7	144455	3,8
213787_s_at	emopamil binding protein (sterol isomerase)	EBP	10682	4,8
218282_at	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2	EDEM2	55741	4,7
220342_x_at	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	EDEM3	80267	3,3
225545_at	eukaryotic elongation factor-2 kinase	EEF2K	29904	3,0
225630_at	endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1	EEPD1	80820	6,0
209536_s_at	EH-domain containing 4	EH4	30844	3,1
225461_at	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	EHMT1	79813	5,1
239377_at	eukaryotic translation initiation factor 1A domain containing	EIF1AD	84285	5,5
201143_s_at	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	EIF2S1	1965	4,5
205321_at	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	EIF2S3	1968	4,0
214805_at	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	EIF4A1	1973	3,2
201435_s_at	eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	1977	4,0
225941_at	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3	EIF4E3	317649	3,0
201123_s_at	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1984	73,9
201122_x_at	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1984	7,3
213753_x_at	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1984	5,6
201726_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	5,9
227746_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	5,0
244660_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	3,4
201510_at	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	ELF3	1999	3,1
228674_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 4	EML4	27436	3,9
229656_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 6	EML6	400954	3,1
204975_at	epithelial membrane protein 2	EMP2	2013	3,9
201340_s_at	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	ENC1	8507	4,5
201313_at	enolase 2 (gamma, neuronal)	ENO2	2026	5,6
229088_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	ENPP1	5167	4,0
203499_at	EPH receptor A2	EPHA2	1969	3,3
202894_at	EPH receptor B4	EPHB4	2050	4,5
232165_at	epiplakin 1	EPPK1	83481	13,7
232164_s_at	epiplakin 1	EPPK1	83481	13,6
222473_s_at	erbB2 interacting protein	ERBB2IP	55914	3,9
228131_at	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	ERCC1	2067	5,3
219905_at	erythroblast membrane-associated protein (Scianna blood group)	ERMAP	114625	6,4
203349_s_at	ets variant 5	ETV5	2119	3,1
208621_s_at	ezrin	EZR	7430	11,9
205738_s_at	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	FABP3	2170	4,4
228790_at	family with sequence similarity 110, member B	FAM110B	90362	3,9
213861_s_at	family with sequence similarity 119, member B	FAM119B	25895	4,6
1554178_a_at	family with sequence similarity 126, member B	FAM126B	285172	3,3
212697_at	family with sequence similarity 134, member C	FAM134C	162427	3,1
213954_at	family with sequence similarity 169, member A	FAM169A	26049	3,0
212771_at	family with sequence similarity 171, member A1	FAM171A1	221061	3,4
51158_at	family with sequence similarity 174, member B	FAM174B	400451	5,4
221880_s_at	family with sequence similarity 174, member B	FAM174B	400451	4,9
226811_at	family with sequence similarity 46, member C	FAM46C	54855	5,8
243011_at	family with sequence similarity 55, member C	FAM55C	91775	6,4
223038_s_at	family with sequence similarity 60, member A / similar to family with sequence similarity 60, member A	FAM60A / LOC728115	58516 / 728115	4,4
228638_at	Family with sequence similarity 76, member A	FAM76A	199870	12,9
228604_at	family with sequence similarity 76, member A	FAM76A	199870	3,5
242560_at	Fanconi anemia, complementation group D2	FANCD2	2177	3,6
202995_s_at	fibulin 1	FBLN1	2192	5,4
212229_s_at	F-box protein 21	FBXO21	23014	6,9
238686_at	F-box protein 3	FBXO3	26273	6,5
229955_at	F-box protein 3	FBXO3	26273	3,7

205310_at	F-box protein 46	FBXO46	23403	4,9
231769_at	F-box protein 6	FBXO6	26270	5,5
1566509_s_at	F-box protein 9	FBXO9	26268	11,7
218751_s_at	F-box and WD repeat domain containing 7	FBXW7	55294	3,8
214212_x_at	fermitin family homolog 2 (Drosophila)	FERMT2	10979	3,8
233898_s_at	FGFR1 oncogene partner 2	FGFR1OP2	26127	4,0
1552664_at	folliculin	FLCN	201163	6,2
241627_x_at	hypothetical protein FLJ10357	FLJ10357	55701	3,0
218920_at	hypothetical protein FLJ10404	FLJ10404	54540	3,6
1553292_s_at	uncharacterized serine/threonine-protein kinase SgK494	FLJ25006	124923	3,2
239015_at	hypothetical LOC439931	FLJ39582	439931	4,7
213940_s_at	formin binding protein 1	FNBP1	23048	5,2
218618_s_at	fibronectin type III domain containing 3B	FNDC3B	64778	3,3
226715_at	forkhead box K1	FOKK1	221937	4,5
205022_s_at	forkhead box N3	FOXN3	1112	7,3
202723_s_at	forkhead box O1	FOXO1	2308	5,1
223287_s_at	forkhead box P1	FOXP1	27086	4,8
223937_at	forkhead box P1	FOXP1	27086	3,3
222570_at	frequenin homolog (Drosophila)	FREQ	23413	3,6
238753_at	frequenin homolog (Drosophila)	FREQ	23413	3,4
227964_at	FERM domain containing 8	FRMD8	83786	4,6
242807_at	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like	FSD1L	83856	3,2
205565_s_at	frataxin	FXN	2395	3,7
206136_at	frizzled homolog 5 (Drosophila)	FZD5	7855	4,7
244396_at	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1	G3BP1	10146	3,5
206383_s_at	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	G3BP2	9908	3,9
1568618_a_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	GALNT1	2589	9,3
212802_s_at	GTPase activating protein and VPS9 domains 1	GAPVD1	26130	4,1
210005_at	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	GART	2618	5,8
209710_at	GATA binding protein 2	GATA2	2624	5,2
218131_s_at	GATA zinc finger domain containing 2A	GATAD2A	54815	5,2
234294_x_at	GATA zinc finger domain containing 2A	GATAD2A	54815	5,0
216733_s_at	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	GATM	2628	3,5
202922_at	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	GCLC	2729	3,8
227550_at	GDNF family receptor alpha 1	GFRA1	2674	4,8
214006_s_at	gamma-glutamyl carboxylase	GGCX	2677	4,0
239617_at	ghrelin opposite strand (non-protein coding)	GHRLOS	100126793	3,7
228755_at	GRB10 interacting GYF protein 1	GIGYF1	64599	4,8
212260_at	GRB10 interacting GYF protein 2	GIGYF2	26058	6,9
207966_s_at	golgi apparatus protein 1	GLG1	2734	4,7
225604_s_at	GLI pathogenesis-related 2	GLIPR2	152007	5,2
225602_at	GLI pathogenesis-related 2	GLIPR2	152007	3,3
219267_at	glycolipid transfer protein	GLTP	51228	4,2
234488_s_at	germ cell-less homolog 1 (Drosophila) / germ cell-less homolog 1 (Drosophila)-like	GMCL1 / GMCL1L	64395 / 64396	3,1
235233_s_at	glucocorticoid modulatory element binding protein 1	GMEB1	10691	4,0
230613_at	glucocorticoid modulatory element binding protein 1	GMEB1	10691	3,5
204248_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	2767	15,3
564_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	2767	14,3
40562_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	2767	11,9
214679_x_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	2767	7,9
213766_x_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	2767	5,0
213944_x_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	2767	4,2
227539_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	GNA13	10672	3,8
204993_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide	GNAZ	2781	4,0
200745_s_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	GNB1	2782	3,2
205184_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	GNG4	2786	7,3
1555765_a_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	GNG4	2786	4,5
1555867_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	GNG4	2786	4,2
228831_s_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7	GNG7	2788	3,1
204630_s_at	golgi SNAP receptor complex member 1	GOSR1	9527	4,1
209220_at	glypican 3	GPC3	2719	3,1
221958_s_at	G protein-coupled receptor 177	GPR177	79971	4,3
228950_s_at	G protein-coupled receptor 177	GPR177	79971	3,4
229105_at	G protein-coupled receptor 39	GPR39	2863	4,1
212856_at	GRAM domain containing 4	GRAMD4	23151	6,8
225451_at	GRIP1 associated protein 1	GRIPAP1	56850	6,5

229377_at	growth hormone regulated TBC protein 1	GRTP1	79774	3,3
200696_s_at	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN	2934	4,2
225609_at	glutathione reductase	GSR	2936	3,4
215766_at	Glutathione S-transferase alpha 1	GSTA1	2938	4,1
35671_at	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	GTF3C1	2975	3,5
202320_at	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	GTF3C1	2975	3,3
219357_at	GTP binding protein 1	GTPBP1	9567	3,7
206643_at	histidine ammonia-lyase	HAL	3034	3,3
213054_at	HAUS augmin-like complex, subunit 5	HAUS5	23354	8,0
36888_at	HAUS augmin-like complex, subunit 5	HAUS5	23354	5,5
202957_at	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	HCLS1	3059	3,6
223640_at	hematopoietic cell signal transducer	HCST	10870	4,8
204225_at	histone deacetylase 4	HDAC4	9759	9,9
228813_at	histone deacetylase 4	HDAC4	9759	6,1
219289_at	HEAT repeat containing 3	HEATR3	55027	5,5
227349_at	helicase, lymphoid-specific	HELLS	3070	4,4
220085_at	helicase, lymphoid-specific	HELLS	3070	3,3
213763_at	homeodomain interacting protein kinase 2	HIPK2	28996	7,3
202708_s_at	histone cluster 2, H2be	HIST2H2BE	8349	15,6
218152_at	high-mobility group 20A	HMG20A	10363	3,8
225601_at	high-mobility group box 3	HMGXB3	3149	6,8
211930_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	220988	3,5
200751_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	HNRNPC	3183	13,0
202072_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	3191	8,5
35201_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	3191	6,3
219976_at	hook homolog 1 (Drosophila)	HOOK1	51361	4,7
235114_x_at	hook homolog 3 (Drosophila)	HOOK3	84376	3,9
235521_at	homeobox A3	HOXA3	3200	3,5
213844_at	homeobox A5	HOXA5	3202	3,8
1554251_at	heterochromatin protein 1, binding protein 3	HP1BP3	50809	7,9
202581_at	heat shock 70kDa protein 1A / heat shock 70kDa protein 1B	HSPA1A / HSPA1B	3303 / 3304	4,2
217618_x_at	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	HUS1	3364	3,2
236294_at	HECT, UBA and WWE domain containing 1	HUWE1	10075	4,9
215513_at	hydattidiform mole associated and imprinted (non-protein coding)	HYMAI	57061	4,2
202439_s_at	iduronate 2-sulfatase	IDS	3423	3,7
203628_at	insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	3480	3,5
202409_at	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) / INS-IGF2 readthrough transcript	IGF2 / INS-IGF2	3481 / 723961	19,6
210881_s_at	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) / INS-IGF2 readthrough transcript	IGF2 / INS-IGF2	3481 / 723961	3,6
202410_x_at	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) / INS-IGF2 readthrough transcript	IGF2 / INS-IGF2	3481 / 723961	3,5
227377_at	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	IGF2BP1	10642	9,0
203819_s_at	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	IGF2BP3	10643	4,4
201392_s_at	insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	3482	7,9
211000_s_at	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	3572	3,6
224744_at	inositol monophosphatase domain containing 1	IMPAD1	54928	6,5
229582_at	INO80 complex subunit C	INO80C	125476	4,1
226555_at	INO80 complex subunit D	INO80D	54891	7,1
227087_at	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type I, 107kDa	INPP4A	3631	3,1
213804_at	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 75kDa	INPP5B	3633	3,2
226216_at	insulin receptor	INSR	3643	5,8
213792_s_at	insulin receptor	INSR	3643	4,8
226450_at	insulin receptor	INSR	3643	4,4
202809_s_at	integrator complex subunit 3	INTS3	65123	5,1
1554739_at	intracisternal A particle-promoted polypeptide	IPP	3652	4,6
229538_s_at	IQ motif containing GTPase activating protein 3	IQGAP3	128239	7,8
224569_s_at	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	IRF2BP2	359948	3,8
221877_at	immunity-related GTPase family, Q	IRGQ	126298	4,8
1555833_a_at	immunity-related GTPase family, Q	IRGQ	126298	3,6
64488_at	immunity-related GTPase family, Q	IRGQ	126298	3,3
239101_at	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	ITCH	83737	3,2
1568619_s_at	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 2	ITPRIL2	162073	7,1
203297_s_at	jumonji, AT rich interactive domain 2	JARID2	3720	3,5
239085_at	Jun dimerization protein 2	JDP2	122953	4,7
221778_at	jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D (S. cerevisiae)	JHDM1D	80853	6,0
237229_at	Jumonji domain containing 5	JMJD5	79831	4,7
227750_at	kalirin, RhoGEF kinase	KALRN	8997	4,4
233644_at	katanin p60 subunit A-like 2	KATNAL2	83473	3,6
226479_at	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 6	KBTBD6	89890	3,1
222471_s_at	potassium channel modulatory factor 1	KCMF1	56888	5,8

234103_at	Potassium channel, subfamily T, member 2	KCNT2	343450	3,4
213474_at	potassium channel tetramerisation domain containing 7	KCTD7	154881	3,2
200922_at	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	KDELR1	10945	4,3
200698_at	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	KDELR2	11014	7,5
1556066_at	lysine (K)-specific demethylase 6B	KDM6B	23135	3,1
204372_s_at	KH-type splicing regulatory protein	KHSRP	8570	4,9
227056_at	KIAA0141	KIAA0141	9812	3,3
38892_at	KIAA0240	KIAA0240	23506	3,9
203955_at	KIAA0649	KIAA0649	9858	5,3
235674_at	KIAA0922	KIAA0922	23240	4,9
213636_at	KIAA1045	KIAA1045	23349	3,6
231807_at	KIAA1217	KIAA1217	56243	8,6
225117_at	KIAA1267	KIAA1267	284058	4,4
223756_at	KIAA1310	KIAA1310	55683	3,4
233893_s_at	KIAA1530	KIAA1530	57654	6,8
228453_at	KIAA1632	KIAA1632	57724	6,1
225525_at	KIAA1671	KIAA1671	85379	3,6
225718_at	KIAA1715	KIAA1715	80856	4,8
227435_at	KIAA2018	KIAA2018	205717	5,7
228446_at	KIAA2026	KIAA2026	158358	6,1
222039_at	kinesin family member 18B	KIF18B	146909	4,7
209234_at	kinesin family member 1B	KIF1B	23095	3,6
225878_at	kinesin family member 1B	KIF1B	23095	3,5
228680_at	kinesin family member 3A	KIF3A	11127	24,5
201991_s_at	kinesin family member 5B	KIF5B	3799	5,5
224606_at	Kruppel-like factor 6	KLF6	1316	6,0
203542_s_at	Kruppel-like factor 9	KLF9	687	4,7
225961_at	kelch domain containing 5	KLHDC5	57542	4,9
226370_at	kelch-like 15 (Drosophila)	KLHL15	80311	4,2
1557165_s_at	kelch-like 18 (Drosophila)	KLHL18	23276	3,4
204177_s_at	kelch-like 20 (Drosophila)	KLHL20	27252	3,0
235727_at	kelch-like 28 (Drosophila)	KLHL28	54813	10,8
221221_s_at	kelch-like 3 (Drosophila)	KLHL3	26249	3,7
226874_at	kelch-like 8 (Drosophila)	KLHL8	57563	4,3
212102_s_at	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	KPNA6	23633	4,8
212103_at	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	KPNA6	23633	4,1
226976_at	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	KPNA6	23633	3,5
214352_s_at	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	KRAS	3845	5,5
222681_at	KTEL (Lys-Tyr-Glu-Leu) containing 1	KTELC1	56983	3,5
229393_at	l(3)mbt-like 3 (Drosophila)	L3MBTL3	84456	3,4
226354_at	lactamase, beta	LACTB	114294	3,1
212193_s_at	La ribonucleoprotein domain family, member 1	LARP1	23367	6,6
210966_x_at	La ribonucleoprotein domain family, member 1	LARP1	23367	3,1
231824_at	La ribonucleoprotein domain family, member 1B	LARP1B	55132	3,4
234985_at	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3	LDLRAD3	143458	3,2
221558_s_at	lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	51176	3,1
202378_s_at	leptin receptor overlapping transcript	LEPROT	54741	5,7
222006_at	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	LETM1	3954	5,5
225571_at	leukemia inhibitory factor receptor alpha	LIFR	3977	3,6
200704_at	lipopolysaccharide-induced TNF factor	LITAF	9516	6,1
225793_at	Lix1 homolog (mouse)-like	LIX1L	128077	4,3
1558152_at	hypothetical LOC100131262	LOC100131262	100131262	4,9
236656_s_at	hypothetical protein LOC100288911	LOC100288911	100288911	3,8
243840_at	arsenic transactivated protein 1	LOC100289612	100289612	3,0
242904_x_at	hypothetical protein LOC100293390	LOC100293390	100293390	3,2
240298_at	hypothetical protein LOC147791	LOC147791	147791	3,3
1557049_at	Hypothetical protein LOC149478	LOC149478	149478	3,7
236652_at	hypothetical protein LOC149703	LOC149703	149703	5,7
232181_at	hypothetical protein LOC153346	LOC153346	153346	7,7
213776_at	hypothetical protein LOC157562	LOC157562	157562	4,4
236769_at	hypothetical protein LOC158402	LOC158402	158402	4,5
1558685_a_at	hypothetical protein BC009467	LOC158960	158960	8,2
213195_at	hypothetical protein LOC201229	LOC201229	201229	5,8
228051_at	Hypothetical protein LOC202451	LOC202451	202451	3,8
1556613_s_at	hypothetical protein LOC203107	LOC203107	203107	4,0
227124_at	hypothetical protein LOC221710	LOC221710	221710	3,1
228894_at	hypothetical protein LOC253842	LOC253842	253842	4,4
1562527_at	hypothetical protein LOC283027	LOC283027	283027	3,8

229528_at	hypothetical protein LOC283378	LOC283378	283378	3,6
227941_at	hypothetical protein LOC339803	LOC339803	339803	3,1
225062_at	hypothetical gene supported by AL713796	LOC389831	389831	3,1
225640_at	hypothetical gene supported by AK091718	LOC401504	401504	4,6
212113_at	hypothetical protein LOC552889	LOC552889	552889	5,6
236555_at	hypothetical LOC643749	LOC643749	643749	4,7
236837_x_at	Similar to FRAS1 related extracellular matrix protein 2	LOC650794	650794	5,1
227567_at	hypothetical LOC651250	LOC651250	651250	3,8
239343_at	hypothetical protein LOC728705	LOC728705	728705	3,5
235010_at	hypothetical protein LOC729013	LOC729013	729013	6,5
227837_at	hypothetical LOC729570	LOC729570	729570	3,2
230433_at	similar to hCG2028352	LOC729970	729970	3,7
238529_at	Hypothetical LOC730631	LOC730631	730631	5,7
1569013_s_at	BMS1 homolog, ribosome assembly protein (yeast) pseudogene	LOC96610	96610	3,7
227723_at	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1	LOH12CR1	118426	3,5
40472_at	lysophosphatidylcholine acyltransferase 4	LPCAT4	254531	5,7
213078_x_at	lysophosphatidylcholine acyltransferase 4	LPCAT4	254531	4,4
230194_at	leucine-rich PPR-motif containing	LRPPRC	10128	6,1
233487_s_at	leucine rich repeat containing 8 family, member A	LRRC8A	56262	7,3
226884_at	leucine rich repeat neuronal 1	LRRN1	57633	14,5
212529_at	LSM12 homolog (S. cerevisiae)	LSM12	124801	12,0
212532_s_at	LSM12 homolog (S. cerevisiae)	LSM12	124801	7,8
231200_at	LSM14B, SCD6 homolog B (S. cerevisiae)	LSM14B	149986	4,7
202729_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1	4052	3,9
202626_s_at	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	LYN	4067	3,7
232283_at	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 1	LYSMD1	388695	3,2
206363_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	MAF	4094	5,1
218559_s_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	MAFB	9935	4,3
226084_at	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	4131	4,8
215498_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	5606	6,1
207667_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	5606	5,0
215499_at	mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	5606	4,2
1552928_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3	MAP3K7IP3	257397	6,4
1558732_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	MAP4K4	9448	3,6
203552_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	MAP4K5	11183	3,4
202501_at	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	MAPRE2	10982	4,0
210075_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 2	MARCH2	51257	7,0
201737_s_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6	MARCH6	10299	4,2
201670_s_at	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	4082	6,2
213002_at	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	4082	3,7
201668_x_at	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	4082	3,7
203942_s_at	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	MARK2	2011	5,3
243529_at	methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	MARS2	92935	6,8
235955_at	MARVEL domain containing 2	MARVELD2	153562	3,9
239350_at	MARVEL domain containing 3	MARVELD3	91862	5,2
213045_at	microtubule associated serine/threonine kinase 3	MAST3	23031	3,3
209331_s_at	MYC associated factor X	MAX	4149	3,4
227379_at	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	MBOAT1	154141	7,3
243552_at	mbt domain containing 1	MBTD1	54799	3,7
238574_at	mitochondrial carrier triple repeat 1	MCART1	92014	3,2
219673_at	minichromosome maintenance complex component 9	MCM9	254394	5,3
236814_at	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)	MDM4	4194	5,6
212693_at	MDN1, midasin homolog (yeast)	MDN1	23195	5,5
228517_at	MYST/Esa1-associated factor 6	MEAF6	64769	5,0
218165_at	MYST/Esa1-associated factor 6	MEAF6	64769	3,4
221884_at	MDS1 and EVI1 complex locus	MECOM	2122	4,9
225452_at	mediator complex subunit 1	MED1	5469	3,1
242911_at	mediator complex subunit 13-like	MED13L	23389	3,6
212207_at	mediator complex subunit 13-like	MED13L	23389	3,1
212872_s_at	mediator complex subunit 20	MED20	9477	3,4
222636_at	mediator complex subunit 28	MED28	80306	3,8
218438_s_at	mediator complex subunit 28	MED28	80306	3,7
219318_x_at	mediator complex subunit 31	MED31	51003	4,0
209199_s_at	myocyte enhancer factor 2C	MEF2C	4208	5,2
206000_at	mepirin A, alpha (PABA peptide hydrolase)	MEP1A	4224	3,6
223264_at	mesoderm development candidate 1	MESDC1	59274	6,6
209861_s_at	methionyl aminopeptidase 2	METAP2	10988	3,6
91816_f_at	mex-3 homolog D (C. elegans)	MEX3D	399664	24,6

1552312_a_at	microfibrillar-associated protein 3	MFAP3	4238	6,7
213457_at	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	MFHAS1	9258	3,4
206522_at	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	MGAM	8972	3,5
1558166_at	hypothetical protein MGC16275	MGC16275	85001	5,3
231844_at	hypothetical protein MGC27345	MGC27345	157247	5,3
230528_s_at	hypothetical LOC65996	MGC2752	65996	3,7
206247_at	MHC class I polypeptide-related sequence B	MICB	4277	3,8
203637_s_at	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	MID1	4281	5,0
225954_s_at	midnolin	MIDN	90007	3,1
218630_at	Meckel syndrome, type 1	MKS1	54903	4,5
222414_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	MLL3	58508	4,4
226100_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	MLL5	55904	4,3
223190_s_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	MLL5	55904	3,7
230122_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	MLLT10	8028	3,9
244523_at	monocyte to macrophage differentiation-associated	MMD	23531	4,6
214812_s_at	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast)	MOBKL1B	55233	3,5
228354_at	MORN repeat containing 4	MORN4	118812	3,9
225237_s_at	musashi homolog 2 (Drosophila)	MSI2	124540	3,0
219451_at	methionine sulfoxide reductase B2	MSRB2	22921	3,6
204326_x_at	metallothionein 1X	MT1X	4501	4,3
211783_s_at	metastasis associated 1	MTA1	9112	12,4
223311_s_at	metastasis associated 1 family, member 3	MTA3	57504	3,6
239035_at	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)	MTHFR	4524	3,2
212277_at	myotubularin related protein 4	MTMR4	9110	5,0
228789_at	myotubularin related protein 6	MTMR6	9107	3,1
213278_at	myotubularin related protein 9	MTMR9	66036	4,3
233873_x_at	mitochondrial poly(A) polymerase	MTPAP	55149	5,1
242996_at	mitochondrial translational release factor 1	MTRF1	9617	3,4
221290_s_at	melanoma associated antigen (mutated) 1	MUM1	84939	6,8
223348_x_at	melanoma associated antigen (mutated) 1	MUM1	84939	5,4
226275_at	MAX dimerization protein 1	MXD1	4084	5,0
202364_at	MAX interactor 1	MXI1	4601	4,7
224920_x_at	myeloid-associated differentiation marker	MYADM	91663	6,4
225673_at	myeloid-associated differentiation marker	MYADM	91663	5,6
213906_at	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	MYBL1	4603	3,6
222772_at	myelin expression factor 2	MYEF2	50804	4,6
229464_at	myelin expression factor 2	MYEF2	50804	3,2
228098_s_at	myosin regulatory light chain interacting protein	MYLIP	29116	4,8
218966_at	myosin VC	MYO5C	55930	4,8
213375_s_at	NEDD4 binding protein 2-like 1	N4BP2L1	90634	4,0
218734_at	N-acetyltransferase 11 (GCN5-related, putative)	NAT11	79829	3,3
222369_at	N-acetyltransferase 11 (GCN5-related, putative)	NAT11	79829	3,2
218330_s_at	neuron navigator 2	NAV2	89797	4,8
1553992_s_at	neighbor of BRCA1 gene 2 (non-protein coding)	NBR2	10230	9,9
207700_s_at	nuclear receptor coactivator 3	NCOA3	8202	7,6
225145_at	nuclear receptor coactivator 5	NCOA5	57727	5,6
225065_x_at	non-protein coding RNA 188	NCRNA00188	125144	6,9
212299_at	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 9	NEK9	91754	4,8
204321_at	neogenin homolog 1 (chicken)	NEO1	4756	10,8
201830_s_at	neuroepithelial cell transforming 1	NET1	10276	5,8
226103_at	nexilin (F actin binding protein)	NEXN	91624	3,6
212676_at	neurofibromin 1	NF1	4763	7,7
218915_at	neurofibromin 2 (merlin)	NF2	4771	3,2
208003_s_at	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	NFAT5	10725	4,0
224970_at	nuclear factor I/A	NFIA	4774	6,7
226806_s_at	nuclear factor I/A	NFIA	4774	3,5
209290_s_at	nuclear factor I/B	NFIB	4781	3,4
202215_s_at	nuclear transcription factor Y, gamma	NFYC	4802	7,8
209104_s_at	NHP2 ribonucleoprotein homolog (yeast)	NHP2	55651	3,0
207705_s_at	ninein-like	NINL	22981	3,2
221104_s_at	nipsnap homolog 3B (C. elegans)	NIPSNAP3B	55335	3,1
218318_s_at	nemo-like kinase	NLK	51701	5,2
1554084_a_at	nucleolar protein 9	NOL9	79707	3,4
218754_at	nucleolar protein 9	NOL9	79707	3,2
225911_at	nephronectin	NPNT	255743	3,1
213479_at	neuronal pentraxin II	NPTX2	4885	3,2
223298_s_at	5'-nucleotidase, cytosolic III	NT5C3	51251	3,6
204589_at	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	NUAK1	9891	3,7

202397_at	nuclear transport factor 2	NUTF2	10204	18,5
228379_at	Nuclear transport factor 2	NUTF2	10204	3,3
219489_s_at	nucleoredoxin	NXN	64359	3,7
226810_at	opioid growth factor receptor-like 1	OGFRL1	79627	4,3
238218_at	oocyte expressed protein homolog (dog)	OOEP	441161	3,2
217529_at	ORAI calcium release-activated calcium modulator 2	ORAI2	80228	3,6
221864_at	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	ORAI3	93129	6,6
201800_s_at	oxysterol binding protein	OSBP	5007	6,0
209626_s_at	oxysterol binding protein-like 3	OSBPL3	26031	4,8
1554008_at	oncostatin M receptor	OSMR	9180	9,2
207543_s_at	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	P4HA1	5033	3,3
201545_s_at	poly(A) binding protein, nuclear 1	PABPN1	8106	5,3
200816_s_at	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, subunit 1 (45kDa)	PAFAH1B1	5048	3,1
222839_s_at	poly(A) polymerase gamma	PAPOLG	64895	3,4
209043_at	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	PAPSS1	9061	3,5
235165_at	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)	PAR6B	84612	3,2
218543_s_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	PARP12	64761	3,0
216945_x_at	PAS domain containing serine/threonine kinase	PASK	23178	3,2
212825_at	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	PAXIP1	22976	6,1
212151_at	pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	5087	3,1
202876_s_at	pre-B-cell leukemia homeobox 2	PBX2	5089	3,3
208620_at	poly(rC) binding protein 1	PCBP1	5093	3,8
213263_s_at	poly(rC) binding protein 2	PCBP2	5094	4,9
204031_s_at	poly(rC) binding protein 2	PCBP2	5094	4,1
231726_at	protocadherin beta 14	PCDHB14	56122	4,7
227622_at	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (S. cerevisiae)	PCF11	51585	3,1
226326_at	polycomb group ring finger 5	PCGF5	84333	3,2
227858_at	pecanex-like 3 (Drosophila)	PCNXL3	399909	3,7
208823_s_at	PCTAIRE protein kinase 1	PCTK1	5127	5,1
203708_at	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila)	PDE4B	5142	8,5
205463_s_at	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	5154	11,0
211048_s_at	protein disulfide isomerase family A, member 4	PDIA4	9601	5,4
216640_s_at	protein disulfide isomerase family A, member 6	PDIA6	10130	3,4
204524_at	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	PDPK1	5170	5,3
222492_at	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	PDXK	8566	4,5
1558164_s_at	peroxisomal biogenesis factor 13	PEX13	5194	5,1
1558163_at	peroxisomal biogenesis factor 13	PEX13	5194	5,0
205246_at	peroxisomal biogenesis factor 13	PEX13	5194	3,6
213302_at	phosphoribosylformylglycinamide synthase	PFAS	5198	5,1
200634_at	profilin 1	PFN1	5216	10,4
227068_at	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	5230	3,7
229553_at	phosphoglucomutase 2-like 1	PGM2L1	283209	4,2
219891_at	pyroglutamyl-peptidase I	PGPEP1	54858	3,3
226823_at	phosphatase and actin regulator 4	PHACTR4	65979	6,0
219235_s_at	phosphatase and actin regulator 4	PHACTR4	65979	4,3
217996_at	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PHLDA1	22822	7,1
235168_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M	PIGM	93183	15,7
224661_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y	PIGY	84992	3,4
204484_at	phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide	PIK3C2B	5287	3,6
204269_at	pim-2 oncogene	PIM2	11040	4,5
204572_s_at	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	PIN4	5303	3,6
237783_at	PLAC8-like 1	PLAC8L1	153770	3,3
213384_x_at	phospholipase C, beta 3 (phosphatidylinositol-specific)	PLCB3	5331	4,1
218951_s_at	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	PLCXD1	55344	4,4
227037_at	phospholipase D family, member 6	PLD6	201164	4,9
235360_at	pleckstrin homology domain containing, family M, member 3	PLEKHM3	389072	3,8
225421_at	peptidase M20 domain containing 2	PM20D2	135293	3,6
210139_s_at	peripheral myelin protein 22	PMP22	5376	3,9
218511_s_at	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	PNPO	55163	8,9
222653_at	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	PNPO	55163	6,1
239392_s_at	pogo transposable element with KRAB domain	POGK	57645	10,5
212153_at	pogo transposable element with ZNF domain	POGZ	23126	4,6
238992_at	polymerase (DNA directed) iota	POLI	11201	3,9
228823_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J2	POLR2J2	246721	4,4
224517_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J4, pseudogene	POLR2J4	84820	5,0
60815_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J4, pseudogene	POLR2J4	84820	3,8
231763_at	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A, 155kDa	POLR3A	11128	3,1

1559496_at	pyrophosphatase (inorganic) 2	PPA2	27068	6,3
203735_x_at	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	PPFIBP1	8496	3,4
226336_at	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	PPIA	5478	3,5
208993_s_at	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	PPIG	9360	4,1
1559263_s_at	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4 / zinc finger CCCH-type containing 12D	PPIL4 / ZC3H12D	340152 / 85313	11,0
203966_s_at	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	PPM1A	5494	3,1
212686_at	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	PPM1H	57460	5,5
235061_at	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	PPM1K	152926	3,6
201408_at	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	PPP1CB	5500	3,0
221088_s_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	PPP1R9A	55607	3,3
200695_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, alpha isoform	PPP2R1A	5518	4,6
222351_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, beta isoform	PPP2R1B	5519	9,1
229322_at	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', epsilon isoform	PPP2R5E	5529	3,8
202425_x_at	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	PPP3CA	5530	4,4
202429_s_at	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	PPP3CA	5530	3,1
208932_at	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	PPP4C	5531	10,6
235828_at	PRELI domain containing 2	PRELID2	153768	3,3
228656_at	prospero homeobox 1	PROX1	5629	7,7
230270_at	PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing B	PRPF38B	55119	3,1
236477_at	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)	PRPF40A	55660	8,1
45687_at	proline rich 14	PRR14	78994	3,1
204795_at	proline rich 3	PRR3	80742	4,3
221734_at	proline-rich coiled-coil 1	PRRC1	133619	3,2
200039_s_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	PSMB2	5690	3,5
228204_at	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4	PSMB4	5692	3,4
201067_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2	PSMC2	5701	6,1
219485_s_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	PSMD10	5716	4,5
1554577_a_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	PSMD10	5716	3,6
208776_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	PSMD11	5717	10,4
208777_s_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	PSMD11	5717	5,7
212220_at	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	PSME4	23198	3,9
243995_at	protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1	PTAR1	375743	3,8
218683_at	polypyrimidine tract binding protein 2	PTBP2	58155	3,3
201433_s_at	phosphatidylserine synthase 1	PTDSS1	9791	10,3
224950_at	prostaglandin F2 receptor negative regulator	PTGFRN	5738	8,1
200772_x_at	prothymosin, alpha	PTMA	5757	4,3
208615_s_at	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	PTP4A2	8073	5,2
234000_s_at	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	PTPLAD1	51495	3,4
222404_x_at	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	PTPLAD1	51495	3,1
200635_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PTPRF	5792	9,9
200636_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PTPRF	5792	3,7
226571_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	PTPRS	5802	4,4
201164_s_at	pumilio homolog 1 (Drosophila)	PUM1	9698	3,0
218984_at	pseudouridylate synthase 7 homolog (S. cerevisiae)	PUS7	54517	4,3
209174_s_at	glutamine-rich 1	QRICH1	54870	4,0
213034_at	serine/threonine-protein kinase QSK	QSK	23387	4,1
229398_at	RAB18, member RAS oncogene family	RAB18	22931	3,2
203885_at	RAB21, member RAS oncogene family	RAB21	23011	3,3
225001_at	RAB3D, member RAS oncogene family	RAB3D	9545	7,1
210406_s_at	RAB6A, member RAS oncogene family / RAB6C, member RAS oncogene family	RAB6A / RAB6C	5870 / 84084	3,9
208819_at	RAB8A, member RAS oncogene family	RAB8A	4218	6,0
204028_s_at	RAB GTPase activating protein 1	RABGAP1	23637	10,7
205647_at	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	RAD52	5893	6,0
204681_s_at	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	RAPGEF5	9771	7,3
203749_s_at	retinoic acid receptor, alpha	RARA	5914	15,6
237333_at	retinoblastoma binding protein 4	RBBP4	5928	4,4
210371_s_at	retinoblastoma binding protein 4	RBBP4	5928	3,2
244872_at	retinoblastoma binding protein 4	RBBP4	5928	3,2
205169_at	retinoblastoma binding protein 5	RBBP5	5929	4,7
204178_s_at	RNA binding motif protein 14 / RNA binding motif protein 4	RBM14 / RBM4	10432 / 5936	4,0
226987_at	RNA binding motif protein 15B	RBM15B	29890	3,9
202689_at	RNA binding motif protein 15B	RBM15B	29890	3,5
243295_at	RNA binding motif protein 27	RBM27	54439	3,3
222496_s_at	RNA binding motif protein 47	RBM47	54502	4,9
212104_s_at	RNA binding motif protein 9	RBM9	23543	3,0
225265_at	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	5937	3,5
218117_at	ring-box 1	RBX1	9978	3,8
231716_at	ring finger and CCCH-type zinc finger domains 2	RC3H2	54542	3,9

229064_s_at	RCAN family member 3	RCAN3	11123	9,1
224578_at	regulator of chromosome condensation 2	RCC2	55920	3,4
227467_at	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	RDH10	157506	3,3
212398_at	radixin	RDX	5962	3,9
212917_x_at	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)	RECQL	5965	3,1
226144_at	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	REXO1	57455	5,6
218564_at	ring finger and WD repeat domain 3	RFWD3	55159	3,3
242442_x_at	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 2	RG9MTD2	93587	3,9
227339_at	RGM domain family, member B	RGMB	285704	5,1
219045_at	ras homolog gene family, member F (in filopodia)	RHOF	54509	5,9
225978_at	ribosomal modification protein rimK-like family member B	RIMKLB	57494	6,7
209684_at	Ras and Rab interactor 2	RIN2	54453	4,3
239843_at	Ras-like without CAAX 1	RIT1	6016	4,3
219897_at	ring finger protein 122	RNF122	79845	3,3
203161_s_at	ring finger protein 8	RNF8	9025	3,2
221909_at	ring finger protein, transmembrane 2	RNFT2	84900	11,5
221908_at	ring finger protein, transmembrane 2	RNFT2	84900	9,4
223824_at	renalase, FAD-dependent amine oxidase	RNLS	55328	3,1
217122_s_at	similar to solute carrier family 35, member E2	RP11-345P4.4	728661	5,0
1553976_a_at	deleted in a mouse model of primary ciliary dyskinesia	RP11-529I10.4	25911	3,6
1556088_at	RPA interacting protein	RPAIN	84268	3,4
240806_at	Ribosomal protein L15	RPL15	6138	4,0
200962_at	ribosomal protein L31	RPL31	6160	4,5
212553_at	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	RPRD2	23248	4,3
235415_at	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	RPRD2	23248	3,9
1554655_a_at	reprimin-like	RPRML	388394	4,2
235309_at	Ribosomal protein S15a	RPS15A	6210	3,1
238935_at	ribosomal protein S27-like	RPS27L	51065	4,2
213179_at	RCD1 required for cell differentiation1 homolog (<i>S. pombe</i>)	RQCD1	9125	3,3
225774_at	ring finger and SPRY domain containing 1	RSPRY1	89970	16,1
225770_at	ring finger and SPRY domain containing 1	RSPRY1	89970	7,5
209360_s_at	runt-related transcription factor 1	RUNX1	861	14,2
225574_at	RWD domain containing 4A	RWDD4A	201965	3,6
218370_s_at	S100P binding protein	S100PBP	64766	3,4
227684_at	sphingosine-1-phosphate receptor 2	S1PR2	9294	8,9
204900_x_at	Sin3A-associated protein, 30kDa	SAP30	8819	4,0
202792_s_at	SAPS domain family, member 2	SAPS2	9701	3,3
209127_s_at	squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3	SART3	9733	7,5
203408_s_at	SATB homeobox 1	SATB1	6304	3,5
213435_at	SATB homeobox 2	SATB2	23314	4,0
228174_at	suppressor of cancer cell invasion	SCAI	286205	4,0
212417_at	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	9522	8,5
228408_s_at	SDA1 domain containing 1	SDAD1	55153	4,6
201287_s_at	syndecan 1	SDC1	6382	5,3
202071_at	syndecan 4	SDC4	6385	3,9
209207_s_at	SEC22 vesicle trafficking protein homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	SEC22B	9554	4,3
216392_s_at	SEC23 interacting protein	SEC23IP	11196	4,8
226619_at	SUMO1/sentrin specific peptidase 1	SEN1	29843	3,4
222523_at	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2	SEN2	59343	4,0
219982_s_at	small EDRK-rich factor 1A (telomeric) / small EDRK-rich factor 1B (centromeric)	SERF1A / SERF1B	728492 / 8293	3,5
209723_at	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	SERPINB9	5272	3,9
207714_s_at	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	SERPINH1	871	3,6
221806_s_at	SET domain containing 5	SETD5	55209	3,3
214305_s_at	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	SF3B1	23451	5,4
243361_at	splicing factor, arginine/serine-rich 12	SFRS12	140890	3,1
226412_at	splicing factor, arginine/serine-rich 18	SFRS18	25957	4,2
205120_s_at	sarcoglycan, beta (43kDa dystrophin-associated glycoprotein)	SGCB	6443	3,6
1553690_at	shugoshin-like 1 (<i>S. pombe</i>)	SGOL1	151648	3,6
225354_s_at	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	SH3BGRL2	83699	3,0
211115_x_at	survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1	8487	6,8
205063_at	survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1	8487	6,5
211114_x_at	survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1	8487	4,5
210779_x_at	survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1	8487	3,2
217640_x_at	spindle and kinetochore associated complex subunit 1	SKA1	220134	5,0
207254_at	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	SLC15A1	6564	3,5
228497_at	solute carrier family 22, member 15	SLC22A15	55356	4,4
203658_at	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	SLC25A20	788	3,8

222529_at	solute carrier family 25, member 37	SLC25A37	51312	3,4
1560062_at	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	SLC29A2	3177	6,4
224580_at	solute carrier family 38, member 1	SLC38A1	81539	4,9
225295_at	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	SLC39A10	57181	3,0
218417_s_at	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1	SLC48A1	55652	7,6
48106_at	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1	SLC48A1	55652	3,9
205921_s_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	SLC6A6	6533	3,0
217851_s_at	slowmo homolog 2 (Drosophila)	SLMO2	51012	9,5
227798_at	SMAD family member 1	SMAD1	4086	3,5
235598_at	SMAD family member 2	SMAD2	4087	3,3
225219_at	SMAD family member 5	SMAD5	4090	3,5
201320_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2	SMARCC2	6601	3,5
212926_at	structural maintenance of chromosomes 5	SMC5	23137	3,2
201794_s_at	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	SMG7	9887	4,4
213624_at	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	SMPDL3A	10924	3,0
222618_at	smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog (C. elegans)	SMU1	55234	3,4
236081_at	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	SNCA	6622	3,2
215905_s_at	small nuclear ribonucleoprotein 40kDa (U5)	SNRNP40	9410	8,0
242146_at	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	SNRPA1	6627	3,4
229618_at	sorting nexin 16	SNX16	64089	3,0
222716_s_at	sorting nexin 24	SNX24	28966	3,3
223027_at	sorting nexin 9	SNX9	51429	3,3
227697_at	suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	9021	10,3
213668_s_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	6659	28,8
201418_s_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	6659	3,3
201417_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	6659	3,1
202935_s_at	SRY (sex determining region Y)-box 9	SOX9	6662	5,2
224760_at	Sp1 transcription factor	SP1	6667	5,1
212468_at	sperm associated antigen 9	SPAG9	9043	4,4
229075_at	spermatogenesis associated 5	SPATA5	166378	3,9
222593_s_at	spermatogenesis associated, serine-rich 2	SPATS2	65244	3,1
235572_at	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	SPC24	147841	7,0
222753_s_at	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	SPCS3	60559	3,3
217827_s_at	spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome)	SPG21	51324	4,9
230885_at	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)	SPG7	6687	3,5
217813_s_at	spindlin 1	SPIN1	10927	3,7
208927_at	speckle-type POZ protein	SPOP	8405	4,7
225658_at	speckle-type POZ protein-like	SPOPL	339745	4,8
1557352_at	squalene epoxidase	SQLE	6713	4,5
213577_at	squalene epoxidase	SQLE	6713	3,2
219055_at	S1 RNA binding domain 1	SRBD1	55133	4,4
211056_s_at	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)	SRD5A1	6715	5,6
210959_s_at	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)	SRD5A1	6715	3,5
227484_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	SRGAP1	57522	5,3
228628_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2 pseudogene 1	SRGAP2P1	653464	5,2
229067_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2 pseudogene 1	SRGAP2P1	653464	3,8
201859_at	serglycin	SRGN	5552	9,5
201224_s_at	serine/arginine repetitive matrix 1	SRRM1	10250	5,0
201225_s_at	serine/arginine repetitive matrix 1	SRRM1	10250	3,5
208610_s_at	serine/arginine repetitive matrix 2	SRRM2	23524	4,9
226229_s_at	SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (S. cerevisiae)	SSU72	29101	3,4
235361_at	STAM binding protein	STAMPB	10617	3,0
208991_at	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT3	6774	5,2
208854_s_at	serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast)	STK24	8428	10,3
208855_s_at	serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast)	STK24	8428	3,9
215505_s_at	striatin, calmodulin binding protein 3	STRN3	29966	3,5
212800_at	syntaxin 6	STX6	10228	4,8
233841_s_at	suppressor of defective silencing 3 homolog (S. cerevisiae)	SUDS3	64426	8,9
222940_at	sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	SULT1E1	6783	5,7
225002_s_at	sulfatase modifying factor 2	SUMF2	25870	7,2
209307_at	SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit	SWAP70	23075	3,9
1554595_at	symplekin	SYMPK	8189	4,2
222728_s_at	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, D, 41kDa	TAF1D	79101	11,0
221617_at	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	TAF9B	51616	3,2
1553593_a_at	T-cell acute lymphocytic leukemia 2	TAL2	6887	3,0

208829_at	TAP binding protein (tapasin)	TAPBP	6892	6,6
227632_at	TBC1 domain family, member 24	TBC1D24	57465	4,6
227908_at	TBC1 domain family, member 24	TBC1D24	57465	3,6
1563839_at	TBC1 domain family, member 7	TBC1D7	51256	4,1
216194_s_at	tubulin folding cofactor B	TBCB	1155	7,8
201804_x_at	tubulin folding cofactor B	TBCB	1155	7,3
211759_x_at	tubulin folding cofactor B	TBCB	1155	7,0
201759_at	tubulin folding cofactor D	TBCD	6904	4,0
201867_s_at	transducin (beta)-like 1X-linked	TBL1X	6907	3,8
225544_at	T-box 3	TBX3	6926	4,2
1553815_a_at	transcription elongation factor A (SII) N-terminal and central domain containing	TCEANC	170082	3,6
212931_at	transcription factor 20 (AR1)	TCF20	6942	3,6
212387_at	transcription factor 4	TCF4	6925	7,2
228837_at	transcription factor 4	TCF4	6925	4,3
212762_s_at	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	6934	4,5
226408_at	TEA domain family member 2	TEAD2	8463	3,4
203611_at	telomeric repeat binding factor 2	TERF2	7014	3,9
202719_s_at	testis derived transcript (3 LIM domains)	TES	26136	4,7
235542_at	tet oncogene family member 3	TET3	200424	3,3
203176_s_at	transcription factor A, mitochondrial	TFAM	7019	4,4
203313_s_at	TGFB-induced factor homeobox 1	TGIF1	7050	6,1
218724_s_at	TGFB-induced factor homeobox 2	TGIF2	60436	6,3
216262_s_at	TGFB-induced factor homeobox 2	TGIF2	60436	3,2
203833_s_at	trans-golgi network protein 2	TGOLN2	10618	3,3
238346_s_at	trimethylguanosine synthase homolog (S. cerevisiae)	TGS1	96764	4,4
223588_at	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2	THAP2	83591	4,5
235086_at	Thrombospondin 1	THBS1	7057	5,0
201110_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057	4,7
243492_at	thioesterase superfamily member 4	THEM4	117145	5,3
226319_s_at	THO complex 4	THOC4	10189	7,9
226320_at	THO complex 4	THOC4	10189	3,2
218848_at	THO complex 6 homolog (Drosophila)	THOC6	79228	4,0
222439_s_at	thyroid hormone receptor associated protein 3	THRAP3	9967	4,9
206555_s_at	THUMP domain containing 1	THUMPD1	55623	3,5
219184_x_at	translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	TIMM22	29928	3,4
229100_s_at	translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	TIMM22	29928	3,2
217612_at	translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (S. cerevisiae)	TIMM50	92609	7,0
47608_at	tight junction associated protein 1 (peripheral)	TJAP1	93643	3,8
202011_at	tight junction protein 1 (zona occludens 1)	TJP1	7082	4,5
204276_at	thymidine kinase 2, mitochondrial	TK2	7084	16,3
228340_at	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE3	7090	3,4
209937_at	transmembrane 4 L six family member 4	TM4SF4	7104	8,0
209150_s_at	transmembrane 9 superfamily member 1	TM9SF1	10548	4,7
220241_at	transmembrane and coiled-coil domains 3	TMCO3	55002	4,2
224676_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	TMED4	222068	28,0
224680_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	TMED4	222068	5,6
242617_at	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 8	TMED8	283578	3,1
225004_at	transmembrane protein 101	TMEM101	84336	3,2
222787_s_at	transmembrane protein 106B	TMEM106B	54664	6,7
219154_at	transmembrane protein 120B	TMEM120B	144404	3,0
228981_at	transmembrane protein 169	TMEM169	92691	6,1
219745_at	transmembrane protein 180	TMEM180	79847	9,9
223186_at	transmembrane protein 189 / ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	TMEM189 / UBE2V1	387521 / 7335	4,1
228671_at	transmembrane protein 201	TMEM201	199953	8,3
229693_at	transmembrane protein 220	TMEM220	388335	6,5
222690_s_at	transmembrane protein 39A	TMEM39A	55254	3,6
222418_s_at	transmembrane protein 43	TMEM43	79188	3,3
218815_s_at	transmembrane protein 51	TMEM51	55092	3,8
225974_at	transmembrane protein 64	TMEM64	169200	3,7
212279_at	transmembrane protein 97	TMEM97	27346	19,3
208097_s_at	thioredoxin-related transmembrane protein 1	TMX1	81542	6,5
231775_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TNFRSF10A	8797	4,6
207643_s_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1A	7132	12,6
213107_at	TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	23043	4,0
221506_s_at	transportin 2	TNPO2	30000	6,1
226428_at	transportin 2	TNPO2	30000	5,0
221507_at	transportin 2	TNPO2	30000	4,6
212318_at	transportin 3	TNPO3	23534	5,6

222820_at	trinucleotide repeat containing 6C	TNRC6C	57690	7,4
221496_s_at	transducer of ERBB2, 2	TOB2	10766	3,8
222243_s_at	transducer of ERBB2, 2	TOB2	10766	3,2
222474_s_at	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	TOMM22	56993	4,6
201683_x_at	TOX high mobility group box family member 4	TOX4	9878	5,3
201746_at	tumor protein p53	TP53	7157	3,1
225402_at	TP53 regulating kinase	TP53RK	112858	3,2
238065_at	tropomyosin 3	TPM3	7170	3,4
213593_s_at	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	TRA2A	29896	14,2
204658_at	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	TRA2A	29896	7,1
229574_at	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	TRA2A	29896	4,9
210180_s_at	transformer 2 beta homolog (Drosophila)	TRA2B	6434	3,8
238494_at	TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1	TRAF3IP1	26146	5,1
201399_s_at	translocation associated membrane protein 1	TRAM1	23471	3,3
219351_at	trafficking protein particle complex 2	TRAPPC2	6399	3,0
217959_s_at	trafficking protein particle complex 4	TRAPPC4	51399	3,6
204341_at	tripartite motif-containing 16	TRIM16	10626	3,1
224806_at	tripartite motif-containing 25	TRIM25	7706	3,5
223132_s_at	tripartite motif-containing 8	TRIM8	81603	7,5
221012_s_at	tripartite motif-containing 8	TRIM8	81603	3,8
209012_at	triple functional domain (PTPRF interacting)	TRIO	7204	8,7
221952_x_at	TRM5 tRNA methyltransferase 5 homolog (S. cerevisiae)	TRMT5	57570	4,5
212852_s_at	TROVE domain family, member 2	TROVE2	6738	6,6
210438_x_at	TROVE domain family, member 2	TROVE2	6738	6,1
207520_at	TROVE domain family, member 2	TROVE2	6738	3,4
204094_s_at	TSC22 domain family, member 2	TSC22D2	9819	4,5
225484_at	testis specific, 14	TSGA14	95681	3,8
244521_at	Teashirt zinc finger homeobox 2	TSHZ2	128553	3,2
230626_at	tetraspanin 12	TSPAN12	23554	5,5
223314_at	tetraspanin 14	TSPAN14	81619	3,6
221002_s_at	tetraspanin 14	TSPAN14	81619	3,1
213922_at	tau tubulin kinase 2	TTBK2	146057	5,4
215146_s_at	tetratricopeptide repeat domain 28	TTC28	23331	3,5
208662_s_at	tetratricopeptide repeat domain 3	TTC3	7267	7,8
1569472_s_at	tetratricopeptide repeat domain 3	TTC3	7267	3,6
226557_at	tetratricopeptide repeat domain 5	TTC5	91875	5,4
212320_at	tubulin, beta	TUBB	203068	3,3
218184_at	tubby like protein 4	TULP4	56995	9,2
224170_s_at	tubby like protein 4	TULP4	56995	5,1
239742_at	Tubby like protein 4	TULP4	56995	4,4
212300_at	taxilin alpha	TXLNA	200081	10,7
218794_s_at	thioredoxin-like 4B	TXNL4B	54957	3,8
238802_at	trypsin domain containing 1	TYSND1	219743	12,1
222602_at	ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	UBA6	55236	3,2
202954_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UBE2C	11065	3,4
225651_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	UBE2E2	7325	6,1
217393_x_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2N-like	UBE2NL	389898	3,2
222395_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2Z	UBE2Z	65264	5,7
211285_s_at	ubiquitin protein ligase E3A	UBE3A	7337	4,7
212403_at	ubiquitin protein ligase E3B	UBE3B	89910	3,3
225444_at	ubiquitin 2	UBN2	254048	8,0
204598_at	U-box domain containing 5	UBOX5	22888	3,0
220757_s_at	UBX domain protein 6	UBXN6	80700	5,2
212840_at	UBX domain protein 7	UBXN7	26043	14,8
221765_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	UGCG	7357	3,3
224967_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	UGCG	7357	3,2
222569_at	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	UGGT1	56886	3,1
227740_at	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	UHMK1	127933	3,3
224638_at	signal peptide peptidase 3	UNQ1887	121665	6,2
224639_at	signal peptide peptidase 3	UNQ1887	121665	4,8
203519_s_at	UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	UPF2	26019	3,6
200883_at	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	UQCRC2	7385	6,0
209136_s_at	ubiquitin specific peptidase 10	USP10	9100	10,5
209475_at	ubiquitin specific peptidase 15	USP15	9958	3,3
226652_at	ubiquitin specific peptidase 3	USP3	9960	5,6
226035_at	ubiquitin specific peptidase 31	USP31	57478	7,2
227256_at	ubiquitin specific peptidase 31	USP31	57478	3,6
1558117_s_at	ubiquitin specific peptidase 31	USP31	57478	3,2

223289_s_at	ubiquitin specific peptidase 38	USP38	84640	3,7
230083_at	ubiquitin specific peptidase 53	USP53	54532	3,2
222032_s_at	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	USP7	7874	3,8
209725_at	UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	UTP20	27340	5,9
1557112_a_at	vacuolar protein sorting 53 homolog (S. cerevisiae)	VPS53	55275	8,4
227229_at	vacuolar protein sorting 53 homolog (S. cerevisiae)	VPS53	55275	3,0
1552536_at	vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A (yeast)	VTI1A	143187	6,4
205809_s_at	Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	8976	3,1
229141_at	WD repeat domain 33	WDR33	55339	5,6
221735_at	WD repeat domain 48	WDR48	57599	3,0
225898_at	WD repeat domain 54	WDR54	84058	3,3
229849_at	WAS/WASL interacting protein family, member 3	WIPF3	644150	4,0
204710_s_at	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	WIPI2	26100	5,0
214699_x_at	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	WIPI2	26100	3,5
202031_s_at	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	WIPI2	26100	3,5
211992_at	WNK lysine deficient protein kinase 1	WNK1	65125	11,5
229103_at	wingless-type MMTV integration site family, member 3	WNT3	7473	3,6
235222_x_at	X-linked inhibitor of apoptosis	XIAP	331	3,0
221728_x_at	X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	XIST	7503	5,6
222649_at	exportin 4	XPO4	64328	3,8
222581_at	xenotropic and polytropic retrovirus receptor	XPR1	9213	3,4
219401_at	xylosyltransferase II	XYLT2	64132	3,4
221939_at	Yip1 domain family, member 2	YIPF2	78992	4,4
222408_s_at	yippee-like 5 (Drosophila)	YPEL5	51646	3,2
214814_at	YTH domain containing 1	YTHDC1	91746	4,3
240459_at	YTH domain containing 1	YTHDC1	91746	3,1
221741_s_at	YTH domain family, member 1	YTHDF1	54915	3,2
210317_s_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	YWHAE	7531	3,4
201901_s_at	YY1 transcription factor	YY1	7528	7,7
227977_at	zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2	ZADH2	284273	6,3
227978_s_at	zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2	ZADH2	284273	3,4
235308_at	zinc finger and BTB domain containing 20	ZBTB20	26137	8,8
205383_s_at	zinc finger and BTB domain containing 20	ZBTB20	26137	4,1
1553858_at	zinc finger and BTB domain containing 3	ZBTB3	79842	3,7
205256_at	zinc finger and BTB domain containing 39	ZBTB39	9880	4,2
225845_at	zinc finger and BTB domain containing 44	ZBTB44	29068	4,8
213065_at	zinc finger, C3H1-type containing	ZFC3H1	196441	4,3
211962_s_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	677	5,6
203556_at	zinc fingers and homeoboxes 2	ZHX2	22882	3,7
213698_at	zinc finger, MYM-type 6	ZMYM6	9204	3,6
206314_at	zinc finger protein 167	ZNF167	55888	3,5
1558184_s_at	zinc finger protein 17	ZNF17	7565	3,4
218006_s_at	zinc finger protein 22 (KOX 15)	ZNF22	7570	7,0
242953_at	zinc finger protein 234	ZNF234	10780	3,3
1554045_at	zinc finger protein 24	ZNF24	7572	3,3
1559449_a_at	Zinc finger protein 254	ZNF254	9534	3,7
205917_at	zinc finger protein 264	ZNF264	9422	3,7
211009_s_at	zinc finger protein 271	ZNF271	10778	3,4
243661_at	zinc finger protein 273	ZNF273	10793	3,1
235520_at	zinc finger protein 280C	ZNF280C	55609	6,8
203521_s_at	zinc finger protein 318	ZNF318	24149	3,9
226820_at	zinc finger protein 362	ZNF362	149076	4,4
226575_at	zinc finger protein 462	ZNF462	58499	3,6
211064_at	zinc finger protein 493	ZNF493	284443	3,3
228138_at	zinc finger protein 498	ZNF498	221785	3,2
41113_at	zinc finger protein 500	ZNF500	26048	3,1
225021_at	zinc finger protein 532	ZNF532	55205	3,3
238316_at	zinc finger protein 567	ZNF567	163081	4,4
206188_at	zinc finger protein 623	ZNF623	9831	5,1
225266_at	zinc finger protein 652	ZNF652	22834	4,7
230534_at	zinc finger protein 678	ZNF678	339500	8,1
243816_at	Zinc finger protein 70	ZNF70	7621	3,6
1554578_at	zinc finger protein 70	ZNF70	7621	3,2
222760_at	zinc finger protein 703	ZNF703	80139	4,0
225848_at	zinc finger protein 746	ZNF746	155061	5,0
238606_at	zinc finger protein 747	ZNF747	65988	17,4
57516_at	zinc finger protein 764	ZNF764	92595	6,4

222120_at	zinc finger protein 764	ZNF764	92595	3,6
1558943_x_at	zinc finger protein 765	ZNF765	91661	5,0
214901_at	zinc finger protein 8	ZNF8	7554	3,8
238437_at	zinc finger protein 805	ZNF805	390980	5,6
235398_at	zinc finger protein 805	ZNF805	390980	4,0
238436_s_at	zinc finger protein 805	ZNF805	390980	3,4
244640_at	zinc finger protein 850 pseudogene	ZNF850P	342892	8,0
1569241_a_at	zinc finger protein 93	ZNF93	81931	7,4
225959_s_at	zinc and ring finger 1	ZNRF1	84937	4,2
223607_x_at	zinc finger, SWIM-type containing 1	ZSWIM1	90204	5,5
217592_at	Zinc finger, SWIM-type containing 1	ZSWIM1	90204	3,9
231517_at	zyg-11 homolog A (C. elegans)	ZYG11A	440590	4,4

ANNEXE 2

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene	FC siHuR
210852_s_at	aminoadipate-semialdehyde synthase	AASS	10157	-2,4
214829_at	aminoadipate-semialdehyde synthase	AASS	10157	-3,0
224821_at	abhydrolase domain containing 14B	ABHD14B	84836	-2,1
230602_at	aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase	ACMSD	130013	-2,4
201661_s_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	ACSL3	2181	-3,1
201660_at	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	ACSL3	2181	-3,9
222592_s_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	ACSL5	51703	2,0
203872_at	actin, alpha 1, skeletal muscle	ACTA1	58	7,1
202274_at	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ACTG2	72	2,4
205997_at	ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28	10863	3,9
208268_at	ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28	10863	3,1
229309_at	adrenergic, beta-1-, receptor	ADRB1	153	3,1
223182_s_at	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	AGPAT3	56894	-2,1
209173_at	anterior gradient homolog 2 (Xenopus laevis)	AGR2	10551	2,4
228969_at	anterior gradient homolog 2 (Xenopus laevis)	AGR2	10551	2,1
212174_at	adenylate kinase 2	AK2	204	-2,2
206561_s_at	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	AKR1B10	57016	-3,1
228941_at	asparagine-linked glycosylation 10, alpha-1,2-glucosyltransferase homolog B (yeast)	ALG10B	144245	-2,0
222808_at	asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S. cerevisiae)	ALG13	79868	-2,1
208498_s_at	amylase, alpha 1A (salivary) / amylase, alpha 1B (salivary) / amylase, alpha 1C (salivary) / amylase, alpha 2A (pancreatic) / amylase, alpha 2B (pancreatic)	AMY1A / AMY1B / AMY1C / AMY2A / AMY2B	276 / 277 / 278 / 279 / 280	-2,1
205141_at	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	ANG	283	2,8
213035_at	ankyrin repeat domain 28	ANKRD28	23243	-2,1
212731_at	ankyrin repeat domain 46	ANKRD46	157567	-6,3
201012_at	annexin A1	ANXA1	301	4,6
233011_at	Annexin A1	ANXA1	301	2,6
201590_x_at	annexin A2	ANXA2	302	-2,6
210427_x_at	annexin A2	ANXA2	302	-2,6
213503_x_at	annexin A2	ANXA2	302	-2,6
208816_x_at	annexin A2 pseudogene 2	ANXA2P2	304	-2,5
205083_at	aldehyde oxidase 1	AOX1	316	2,3
205082_s_at	aldehyde oxidase 1	AOX1	316	2,0
204450_x_at	apolipoprotein A-I	APOA1	335	-2,4
217073_x_at	apolipoprotein A-I	APOA1	335	-2,5
205820_s_at	apolipoprotein C-III	APOC3	345	-3,7
214910_s_at	apolipoprotein M	APOM	55937	-2,9
205682_x_at	apolipoprotein M	APOM	55937	-3,1
202630_at	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	APPBP2	10513	-3,4
39248_at	aquaporin 3 (Gill blood group)	AQP3	360	-8,7
226228_at	aquaporin 4	AQP4	361	2,4
205239_at	amphiregulin	AREG	374	6,9
206177_s_at	arginase, liver	ARG1	383	-2,1
203946_s_at	arginase, type II	ARG2	384	-2,7
200760_s_at	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5	ARL6IP5	10550	2,6
200761_s_at	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5	ARL6IP5	10550	2,1
227444_at	Armadillo repeat containing, X-linked 4	ARMCX4	158947	-2,7
205673_s_at	ankyrin repeat and SOCS box-containing 9	ASB9	140462	-2,2
224850_at	ATPase family, AAA domain containing 1	ATAD1	84896	-2,2
228381_at	Activating transcription factor 7 interacting protein 2	ATF7IP2	80063	-2,1
205539_at	advillin	AVIL	10677	-2,3
227904_at	5-azacytidine induced 2	AZI2	64343	2,5
235333_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6	B4GALT6	9331	-2,2
221234_s_at	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	60468	-2,1
203140_at	B-cell CLL/lymphoma 6	BCL6	604	-2,0
218332_at	brain expressed, X-linked 1	BEX1	55859	2,9
215440_s_at	brain expressed, X-linked 4	BEX4	56271	-2,0
209203_s_at	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	BICD2	23299	-2,3
201849_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	664	-2,0
201848_s_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	664	-2,2
221479_s_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	BNIP3L	665	-2,3
221478_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	BNIP3L	665	-2,9
204586_at	basoon (presynaptic cytomatrix protein)	BSN	8927	2,1
232230_at	Chromosome 10 open reading frame 75	C10orf75	90271	-3,3
218723_s_at	chromosome 13 open reading frame 15	C13orf15	28984	2,0
209574_s_at	chromosome 18 open reading frame 1	C18orf1	753	-2,6
242149_at	chromosome 18 open reading frame 19	C18orf19	125228	-2,0

230739_at	chromosome 18 open reading frame 19	C18orf19	125228	-2,2
202357_s_at	complement component 2 / complement factor B	C2 / CFB	629 / 717	-4,1
217737_x_at	chromosome 20 open reading frame 43	C20orf43	51507	-2,0
233842_x_at	chromosome 20 open reading frame 43	C20orf43	51507	-2,1
234926_s_at	chromosome 20 open reading frame 43	C20orf43	51507	-2,2
235088_at	chromosome 4 open reading frame 46	C4orf46	201725	2,6
218904_s_at	chromosome 9 open reading frame 40	C9orf40	55071	-2,4
223005_s_at	chromosome 9 open reading frame 5	C9orf5	23731	-2,2
223006_s_at	chromosome 9 open reading frame 5	C9orf5	23731	-2,5
223008_s_at	chromosome 9 open reading frame 5	C9orf5	23731	-2,6
223007_s_at	chromosome 9 open reading frame 5	C9orf5	23731	-2,7
208683_at	calpain 2, (m/II) large subunit	CAPN2	824	2,5
218456_at	caprin family member 2	CAPRN2	65981	-2,0
243386_at	castor zinc finger 1	CASZ1	54897	-2,5
212097_at	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	CAV1	857	2,0
203324_s_at	caveolin 2	CAV2	858	2,0
209213_at	carbonyl reductase 1	CBR1	873	-3,0
213626_at	carbonyl reductase 4	CBR4	84869	-3,2
211434_s_at	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	CCRL2	9034	2,1
209835_x_at	CD44 molecule (Indian blood group)	CD44	960	2,2
212063_at	CD44 molecule (Indian blood group)	CD44	960	2,1
224709_s_at	CDC42 small effector 2	CDC42SE2	56990	3,5
1552612_at	CDC42 small effector 2	CDC42SE2	56990	2,4
1552613_s_at	CDC42 small effector 2	CDC42SE2	56990	2,3
213348_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	1028	-2,2
213182_x_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	1028	-2,2
219534_x_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	1028	-2,5
204159_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	CDKN2C	1031	-4,3
226185_at	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1	CDS1	1040	-2,2
235918_x_at	centrosomal protein 97kDa	CEP97	79598	-2,3
204260_at	chromogranin B (secretogranin 1)	CHGB	1114	9,5
226350_at	choroideremia-like (Rab escort protein 2)	CHML	1122	-2,1
218177_at	chromatin modifying protein 1B	CHMP1B	57132	-2,0
202538_s_at	chromatin modifying protein 2B	CHMP2B	25978	-2,1
202536_at	chromatin modifying protein 2B	CHMP2B	25978	-2,3
202712_s_at	creatine kinase, mitochondrial 1A / creatine kinase, mitochondrial 1B	CKMT1A / CKMT1B	1159 / 548596	2,3
229777_at	clarin 3	CLRN3	119467	-2,8
203951_at	calponin 1, basic, smooth muscle	CNN1	1264	3,0
221019_s_at	collectin sub-family member 12	COLEC12	81035	-2,2
223500_at	complexin 1	CPLX1	10815	4,9
203633_at	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	CPT1A	1374	-2,1
200621_at	cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	1465	2,2
227757_at	cullin 4A	CUL4A	8451	2,0
224735_at	cytochrome b, ascorbate dependent 3	CYBASC3	220002	-2,1
213295_at	cytindromatosis (turban tumor syndrome)	CYLD	1540	-2,1
205999_x_at	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4	1576	-2,2
211843_x_at	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	CYP3A7	1551	-3,1
205939_at	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	CYP3A7	1551	-3,4
206515_at	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3	CYP4F3	4051	-2,9
222101_s_at	dachsous 1 (Drosophila)	DCHS1	8642	-2,3
217973_at	dicarbonyl/L-xylulose reductase	DCXR	51181	-2,1
202887_s_at	DNA-damage-inducible transcript 4	DDIT4	54541	-2,4
226980_at	DEP domain containing 1B	DEPDC1B	55789	-2,2
229579_s_at	dispatched homolog 2 (Drosophila)	DISP2	85455	2,1
214717_at	hypothetical protein DKFZp434H1419	DKFZp434H1419	150967	-2,4
225809_at	prostatic androgen-repressed message-1	DKFZP564O0823	25849	-2,7
214247_s_at	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	DKK3	27122	-2,0
203791_at	Dmx-like 1	DMXL1	1657	-2,1
213097_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	DNAJC2	27000	2,1
201537_s_at	dual specificity phosphatase 3	DUSP3	1845	2,1
228033_at	E2F transcription factor 7	E2F7	144455	-2,0
222802_at	endothelin 1	EDN1	1906	2,0
227708_at	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	1915	-2,4
208756_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I	EIF3I	8668	2,4
201726_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	-3,8
227746_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	-4,5
201727_s_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	-5,0
244660_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1	1994	-5,1

220625_s_at	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	ELF5	2001	-2,4
229656_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 6	EML6	400954	-2,2
1553672_at	enabled homolog (Drosophila)	ENAH	55740	2,3
201313_at	enolase 2 (gamma, neuronal)	ENO2	2026	-2,2
202596_at	endosulfine alpha	ENSA	2029	-2,1
229892_at	EP400 N-terminal like	EP400NL	347918	2,2
207257_at	erythropoietin	EPO	2056	-2,1
232165_at	epiplakin 1	EPPK1	83481	2,8
232164_s_at	epiplakin 1	EPPK1	83481	2,6
205767_at	epiregulin	EREG	2069	4,1
208958_at	endoplasmic reticulum protein 44	ERP44	23071	-2,2
213506_at	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2RL1	2150	2,1
231029_at	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	F5	2153	-3,3
231693_at	Fatty acid binding protein 1, liver	FABP1	2168	-2,3
205892_s_at	fatty acid binding protein 1, liver	FABP1	2168	-2,7
220643_s_at	Fas apoptotic inhibitory molecule	FAIM	55179	-2,1
1554668_a_at	family with sequence similarity 151, member A	FAM151A	338094	-3,4
241981_at	family with sequence similarity 20, member A	FAM20A	54757	-2,1
224280_s_at	family with sequence similarity 54, member B	FAM54B	56181	-2,5
1554795_a_at	filamin binding LIM protein 1	FBLIM1	54751	2,0
225258_at	filamin binding LIM protein 1	FBLIM1	54751	2,0
218831_s_at	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha	FCGR1	2217	-3,0
231382_at	Fibroblast growth factor 18	FGF18	8817	3,2
206987_x_at	fibroblast growth factor 18	FGF18	8817	2,3
211029_x_at	fibroblast growth factor 18	FGF18	8817	2,3
202949_s_at	four and a half LIM domains 2	FHL2	2274	2,2
204359_at	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	23768	-2,1
202275_at	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	2539	2,2
207010_at	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1	GABRB1	2560	-2,3
205670_at	galactose-3-O-sulfotransferase 1	GAL3ST1	9514	2,2
204965_at	group-specific component (vitamin D binding protein)	GC	2638	-2,2
226271_at	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	54332	3,0
226269_at	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	54332	2,6
205498_at	growth hormone receptor	GHR	2690	-2,1
201667_at	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	GJA1	2697	2,0
226142_at	GLI pathogenesis-related 1	GLIPR1	11010	2,8
204222_s_at	GLI pathogenesis-related 1	GLIPR1	11010	2,7
226136_at	GLI pathogenesis-related 1	GLIPR1	11010	2,4
214085_x_at	GLI pathogenesis-related 1	GLIPR1	11010	2,0
203157_s_at	glutaminase	GLS	2744	-2,7
203159_at	glutaminase	GLS	2744	-3,1
214071_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type	GNAL	2774	-2,2
202615_at	Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	2776	-2,1
224861_at	Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	2776	-2,1
224863_at	Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	2776	-2,2
224862_at	Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	2776	-2,9
201921_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	GNG10	2790	2,3
205184_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	GNG4	2786	2,2
1555765_a_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	GNG4	2786	2,1
227022_at	glucosamine-6-phosphate deaminase 2	GNPDA2	132789	-2,3
232267_at	G protein-coupled receptor 133	GPR133	283383	-6,0
207183_at	G protein-coupled receptor 19	GPR19	2842	-2,3
206312_at	guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)	GUCY2C	2984	-2,4
204805_s_at	H1 histone family, member X	H1FX	8971	-2,0
220491_at	hepcidin antimicrobial peptide	HAMP	57817	-2,2
223541_at	hyaluronan synthase 3	HAS3	3038	2,1
216326_s_at	histone deacetylase 3	HDAC3	8841	2,0
44783_s_at	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	HEY1	23462	-2,0
228621_at	hemochromatosis type 2 (juvenile)	HFE2	148738	-2,7
203253_s_at	histidine acid phosphatase domain containing 1	HISPPD1	23262	-2,2
214455_at	histone cluster 1, H2bc	HIST1H2BC	8347	-2,6
236193_at	histone cluster 1, H2bc	HIST1H2BC	8347	-2,7
202708_s_at	histone cluster 2, H2be	HIST2H2BE	8349	-2,4
204130_at	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	HSD11B2	3291	-2,6
209292_at	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	3400	-2,6
210587_at	inhibin, beta E	INHBE	83729	-4,3
209185_s_at	insulin receptor substrate 2	IRS2	8660	-2,2

225798_at	JAZF zinc finger 1	JAZF1	221895	-2,3
238789_at	KN motif and ankyrin repeat domains 1	KANK1	23189	2,0
203845_at	K(lysine) acetyltransferase 2B	KAT2B	8850	-2,1
227713_at	katanin p60 subunit A-like 1	KATNAL1	84056	-2,5
229850_at	3-ketodihydrosphingosine reductase	KDSR	2531	-3,1
236518_at	KIAA1984	KIAA1984	84960	-2,5
242517_at	KISS1 receptor	KISS1R	84634	-2,6
212327_at	LIM and calponin homology domains 1	LIMCH1	22998	-2,1
212328_at	LIM and calponin homology domains 1	LIMCH1	22998	-2,4
221568_s_at	lin-7 homolog C (C. elegans)	LIN7C	55327	-2,0
1564838_a_at	hypothetical LOC151760	LOC151760	151760	2,6
230057_at	hypothetical protein LOC285178	LOC285178	285178	-2,1
1562640_at	hypothetical protein LOC285943	LOC285943	285943	-2,3
1555216_a_at	hypothetical LOC645722	LOC645722	645722	-2,3
209978_s_at	lipoprotein, Lp(a) / plasminogen	LPA / PLG	4018 / 5340	-2,5
206363_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	MAF	4094	-2,4
209348_s_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	MAF	4094	-2,6
218559_s_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	MAFB	9935	-4,2
228885_at	MAM domain containing 2	MAMDC2	256691	-2,7
217993_s_at	methionine adenosyltransferase II, beta	MAT2B	27430	-2,3
214397_at	methyl-CpG binding domain protein 2	MBD2	8932	7,4
214396_s_at	methyl-CpG binding domain protein 2	MBD2	8932	3,9
213127_s_at	mediator complex subunit 8	MED8	112950	-2,1
213126_at	mediator complex subunit 8	MED8	112950	-2,2
91816_f_at	mex-3 homolog D (C. elegans)	MEX3D	399664	2,0
226039_at	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A	MGAT4A	11320	-2,4
36830_at	mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	4285	2,5
204305_at	mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	4285	2,1
213171_s_at	matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)	MMP24	10893	2,5
203781_at	mitochondrial ribosomal protein L33	MRPL33	9553	-2,7
243010_at	musashi homolog 2 (Drosophila)	MSI2	124540	2,0
205614_x_at	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	MST1	4485	-2,1
216320_x_at	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	MST1	4485	-2,3
213380_x_at	macrophage stimulating, pseudogene 9	MSTP9	11223	-2,6
215563_s_at	macrophage stimulating, pseudogene 9	MSTP9	11223	-3,0
217546_at	metallothionein 1M	MT1M	4499	2,6
229160_at	melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1	MUM1L1	139221	2,5
213906_at	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	MYBL1	4603	-2,1
201058_s_at	myosin, light chain 9, regulatory	MYL9	10398	2,4
224801_at	Nedd4 family interacting protein 2	NDFIP2	54602	-2,2
226974_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	NEDD4L	23327	-2,1
222774_s_at	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	NETO2	81831	2,3
226991_at	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	NFATC2	4773	-2,2
225911_at	nephronectin	NPNT	255743	-2,1
206801_at	natriuretic peptide precursor B	NPPB	4879	6,3
202647_s_at	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	NRAS	4893	-2,2
224985_at	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	NRAS	4893	-2,4
206343_s_at	neuregulin 1	NRG1	3084	2,6
217583_at	phenylalanine hydroxylase	PAH	5053	-2,7
231018_at	Paralemmin-3	PALM3	342979	-2,1
1558322_a_at	progesterone and adipoQ receptor family member IX	PAQR9	344838	2,6
214121_x_at	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	PDLIM7	9260	4,0
214266_s_at	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	PDLIM7	9260	3,6
203369_x_at	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	PDLIM7	9260	2,5
1560359_at	Pelota homolog (Drosophila)	PELO	53918	-2,7
217996_at	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PHLDA1	22822	2,0
219093_at	phosphotyrosine interaction domain containing 1	PID1	55022	-2,1
202743_at	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	PIK3R3	8503	-2,0
210145_at	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	PLA2G4A	5321	2,5
209318_x_at	pleiomorphic adenoma gene-like 1	PLAGL1	5325	-2,1
207002_s_at	pleiomorphic adenoma gene-like 1	PLAGL1	5325	-2,2
209977_at	plasminogen	PLG	5340	-2,3
205267_at	POU class 2 associating factor 1	POU2AF1	5450	-2,2
203407_at	periplakin	PPL	5493	2,0
236302_at	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)	PPM1E	22843	2,2
213849_s_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, beta isoform	PPP2R2B	5521	-2,0
238513_at	Proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	PRRG4	79056	-2,2

226279_at	protease, serine, 23	PRSS23	11098	2,4
202458_at	protease, serine, 23	PRSS23	11098	2,1
1554614_a_at	polypyrimidine tract binding protein 2	PTBP2	58155	3,2
218683_at	polypyrimidine tract binding protein 2	PTBP2	58155	3,0
221840_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	PTPRE	5791	-2,4
201087_at	paxillin	PXN	5829	2,1
228540_at	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI	9444	-2,0
236154_at	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI	9444	-2,5
212636_at	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI	9444	-3,1
205174_s_at	glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT	25797	2,2
242414_at	quinolate phosphoribosyltransferase	QPRT	23475	-2,0
238695_s_at	RAB39B, member RAS oncogene family	RAB39B	116442	-2,1
210335_at	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 9	RASSF9	9182	2,0
1554095_at	RNA binding motif protein 33	RBM33	155435	2,0
204319_s_at	regulator of G-protein signaling 10	RGS10	6001	2,3
210138_at	regulator of G-protein signaling 20	RGS20	8601	2,1
205158_at	ribonuclease, RNase A family, 4	RNASE4	6038	2,5
213397_x_at	ribonuclease, RNase A family, 4	RNASE4	6038	2,2
210426_x_at	RAR-related orphan receptor A	RORA	6095	-2,6
210479_s_at	RAR-related orphan receptor A	RORA	6095	-2,8
226682_at	RAR-related orphan receptor A	RORA	6095	-5,0
1560477_a_at	sterile alpha motif domain containing 11	SAMD11	148398	-2,1
201569_s_at	sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)	SAMM50	25813	2,1
201570_at	sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)	SAMM50	25813	2,0
213435_at	SATB homeobox 2	SATB2	23314	-2,5
212417_at	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	9522	-2,1
212425_at	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	9522	-2,2
219196_at	secretogranin III	SCG3	29106	4,9
203453_at	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	SCNN1A	6337	-7,6
228407_at	signal peptide, CUB domain, EGF-like 3	SCUBE3	222663	-2,7
201583_s_at	Sec23 homolog B (S. cerevisiae)	SEC23B	10483	-2,1
201582_at	Sec23 homolog B (S. cerevisiae)	SEC23B	10483	-2,5
203789_s_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	SEMA3C	10512	2,1
215028_at	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	SEMA6A	57556	-2,1
223449_at	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	SEMA6A	57556	-2,2
225660_at	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	SEMA6A	57556	-2,4
229620_at	Selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	6414	-2,3
206325_at	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 6	SERPINA6	866	-2,4
210049_at	serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	SERPINC1	462	-2,2
1554491_a_at	serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	SERPINC1	462	-2,2
205576_at	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1	SERPIND1	3053	-2,2
200986_at	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	SERPING1	710	-2,7
225118_at	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	SETD8	387893	2,1
221263_s_at	splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa	SF3B5	83443	2,4
201810_s_at	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	SH3BP5	9467	-2,0
201811_x_at	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	SH3BP5	9467	-3,2
212810_s_at	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	SLC1A4	6509	-2,1
223605_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18	SLC25A18	83733	2,1
238418_at	solute carrier family 35, member B4	SLC35B4	84912	-2,3
225882_at	solute carrier family 35, member B4	SLC35B4	84912	-2,3
225881_at	solute carrier family 35, member B4	SLC35B4	84912	-2,8
227620_at	solute carrier family 44, member 1	SLC44A1	23446	-2,1
223748_at	solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 11	SLC4A11	83959	-2,1
202508_s_at	synaptosomal-associated protein, 25kDa	SNAP25	6616	-2,1
223241_at	sorting nexin 8	SNX8	29886	2,0
210677_at	sterol O-acyltransferase 2	SOAT2	8435	-2,0
203373_at	suppressor of cytokine signaling 2	SOCS2	8835	4,8
203372_s_at	suppressor of cytokine signaling 2	SOCS2	8835	4,4
205406_s_at	sperm autoantigenic protein 17	SPA17	53340	-2,1
219888_at	sperm associated antigen 4	SPAG4	6676	-3,3
215617_at	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	SPATS2L	26010	-2,9
1554807_a_at	spire homolog 1 (Drosophila)	SPIRE1	56907	-2,0
225018_at	spire homolog 1 (Drosophila)	SPIRE1	56907	-2,4
1554114_s_at	slingshot homolog 2 (Drosophila)	SSH2	85464	2,1

203019_x_at	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	SSX2IP	117178	-2,1
210871_x_at	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	SSX2IP	117178	-2,2
227725_at	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylglucosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GALNAC1	55808	3,1
203438_at	stanniocalcin 2	STC2	8614	-2,2
218424_s_at	STEAP family member 3	STEAP3	55240	2,2
200783_s_at	stathmin 1	STMN1	3925	-2,0
222557_at	stathmin-like 3	STMN3	50861	3,4
227480_at	sushi domain containing 2	SUSD2	56241	-2,0
1554300_a_at	SVOP-like	SVOPL	136306	-2,1
242093_at	synaptotagmin-like 5	SYTL5	94122	-2,2
236248_x_at	transcriptional adaptor 2 (ADA2 homolog, yeast)-beta	TADA2B	93624	-2,5
205547_s_at	transgelin	TAGLN	6876	2,5
1555724_s_at	transgelin	TAGLN	6876	2,3
225973_at	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	TAP2	6891	-3,5
226388_at	transcription elongation factor A (SII), 3	TCEA3	6920	-2,1
235694_at	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	TCFL5	10732	2,2
205513_at	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	TCN1	6947	5,8
209909_s_at	transforming growth factor, beta 2	TGFB2	7042	2,6
220407_s_at	transforming growth factor, beta 2	TGFB2	7042	2,3
223588_at	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2	THAP2	83591	-2,0
239336_at	Thrombospondin 1	THBS1	7057	4,8
201108_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057	2,7
201109_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057	2,5
201107_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057	2,4
201110_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057	2,0
215171_s_at	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	TIMM17A	10440	2,1
213351_s_at	transmembrane and coiled-coil domain family 1	TMCC1	23023	-3,1
213352_at	transmembrane and coiled-coil domain family 1	TMCC1	23023	-3,2
227112_at	transmembrane and coiled-coil domain family 1	TMCC1	23023	-3,4
218531_at	transmembrane protein 134	TMEM134	80194	2,1
235614_at	transmembrane protein 151A	TMEM151A	256472	2,2
220532_s_at	transmembrane protein 176B	TMEM176B	28959	-2,0
227890_at	transmembrane protein 198	TMEM198	130612	3,1
219410_at	transmembrane protein 45A	TMEM45A	55076	-3,5
237515_at	transmembrane protein 56	TMEM56	148534	-2,1
225302_at	thioredoxin-related transmembrane protein 3	TMX3	54495	-2,2
207426_s_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	TNFSF4	7292	-3,9
221748_s_at	tensin 1	TNS1	7145	-3,9
225912_at	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	TP53INP1	94241	-2,1
206117_at	tropomyosin 1 (alpha)	TPM1	7168	3,4
212654_at	tropomyosin 2 (beta)	TPM2	7169	2,5
224164_at	tropomyosin 3	TPM3	7170	2,0
217759_at	tripartite motif-containing 44	TRIM44	54765	-2,2
217760_at	tripartite motif-containing 44	TRIM44	54765	-2,2
219201_s_at	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	TWSG1	57045	2,1
212751_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	UBE2N	7334	-7,9
211184_s_at	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)	USH1C	10083	-2,2
205844_at	vanin 1	VNN1	8876	-2,6
220528_at	vanin 3	VNN3	55350	-2,1
243764_at	V-set and immunoglobulin domain containing 1	VSIG1	340547	3,4
234370_at	V-set and immunoglobulin domain containing 1	VSIG1	340547	2,0
236849_at	vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A (yeast)	VTI1A	143187	2,1
209452_s_at	vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B (yeast)	VTI1B	10490	2,1
235850_at	WD repeat domain 5B	WDR5B	54554	-2,4
244344_at	WNK lysine deficient protein kinase 4	WNK4	65266	-2,0
229158_at	WNK lysine deficient protein kinase 4	WNK4	65266	-2,2
222489_s_at	Werner helicase interacting protein 1	WRNIP1	56897	-2,1
236105_at	zinc finger and BTB domain containing 10	ZBTB10	65986	-2,0
236896_at	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	ZIC1	7545	-2,2
223216_x_at	zinc finger protein 395	ZNF395	55893	-2,1
221123_x_at	zinc finger protein 395	ZNF395	55893	-2,1
218149_s_at	zinc finger protein 395	ZNF395	55893	-2,3
232028_at	zinc finger protein 678	ZNF678	339500	-2,3
242923_at	zinc finger protein 678	ZNF678	339500	-2,7
230534_at	zinc finger protein 678	ZNF678	339500	-3,4

LISTE DES COMMUNICATIONS

Liste des communications affichées :

Communications affichées nationales :

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Analyse de l'expression de trois ARE-BPs (ARE Binding Protein) dans le carcinome hépatocellulaire.* 65èmes Journées de l'AFEF. Paris, 30 septembre au 3 octobre 2009.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Régulation positive de l'expression du GPC3 dans le CHC par la protéine AUF1.* 3ème colloque sur la Génomique Fonctionnelle du Foie. Rennes, 11-12 mars 2010.

Communications affichées locales :

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Analyse de l'expression de trois ARE-BPs (ARE Binding Protein) dans le carcinome hépatocellulaire.* 2ème Journée Doc's 66 meeting. Bordeaux, 24 juin 2008.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Analyse de l'expression de trois ARE-BPs (ARE Binding Protein) dans le carcinome hépatocellulaire.* Journée scientifique de l'IFR 66 Pathologies Infectieuses et cancers. Bordeaux, 2 décembre 2008.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Analyse de l'expression de trois ARE-BPs (ARE Binding Protein) dans le carcinome hépatocellulaire.* 9^e Journée Scientifique de l'école doctorale sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, 8 avril 2009.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Analyse de l'expression de trois ARE-BPs (ARE Binding Protein) dans le carcinome hépatocellulaire.* 3ème Journée Doc's 66 meeting. Bordeaux, 23 juin 2009.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Analyse de l'expression de trois ARE-BPs (ARE Binding Protein) dans le carcinome hépatocellulaire.* Journée scientifique de l'IFR 66 Pathologies Infectieuses et cancers. Bordeaux, 1^{er} décembre 2009.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Régulation positive de l'expression du GPC3 dans le CHC par la protéine AUF1.* 10^e Journée Scientifique de l'école doctorale sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, 28 avril 2010.

T. Valbuzzi, G. Cubel, S. Lepreux, P. Bouliac-Sage, C. Grosset, F. Saggiocco. *Régulation positive de l'expression du GPC3 dans le CHC par la protéine AUF1.* 4ème Journée Doc's 66 meeting. Bordeaux, 22 juin 2010.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDELMOHSEN, K. AND M. GOROSPE (2010). "POSTTRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CANCER TRAITS BY HUR." WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS - RNA **1**(2): 214-229.
- ABDELMOHSEN, K., A. LAL, ET AL. (2007). "POSTTRANSCRIPTIONAL ORCHESTRATION OF AN ANTI-APOPTOTIC PROGRAM BY HUR." CELL CYCLE **6**(11): 1288-92.
- ACEVEDO, L. G., M. BIEDA, ET AL. (2008). "ANALYSIS OF THE MECHANISMS MEDIATING TUMOR-SPECIFIC CHANGES IN GENE EXPRESSION IN HUMAN LIVER TUMORS." CANCER RESEARCH **68**(8): 2641-2651.
- ADAMI, H.-O., W.-H. CHOW, ET AL. (1996). "EXCESS RISK OF PRIMARY LIVER CANCER IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS." J. NATL. CANCER INST. **88**(20): 1472-1477.
- ADAMS, D. H. AND B. EKSTEEN (2006). "ABERRANT HOMING OF MUCOSAL T CELLS AND EXTRA-INTESTINAL MANIFESTATIONS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE." NAT REV IMMUNOL **6**(3): 244-251.
- AKOOL, E.-S., H. KLEINERT, ET AL. (2003). "NITRIC OXIDE INCREASES THE DECAY OF MATRIX METALLOPROTEINASE 9 mRNA BY INHIBITING THE EXPRESSION OF mRNA-STABILIZING FACTOR HUR." MOL. CELL. BIOL. **23**(14): 4901-4916.
- AKUTSU, N., H. YAMAMOTO, ET AL. (2010). "ASSOCIATION OF GLYPICAN-3 EXPRESSION WITH GROWTH SIGNALING MOLECULES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA." WORLD J GASTROENTEROL **16**(28): 3521-8.
- ANDERSON, P. AND N. KEDERSHA (2002). "VISIBLY STRESSED: THE ROLE OF EIF2, TIA-1, AND STRESS GRANULES IN PROTEIN TRANSLATION." CELL STRESS CHAPERONES **7**(2): 213-21.
- ANDERSON, P., K. PHILLIPS, ET AL. (2004). "POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF PROINFLAMMATORY PROTEINS." LEUKOCYTES **76**(1): 42-7.
- AUDIC, Y. AND R. S. HARTLEY (2004). "POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN CANCER." BIOLOGY OF THE CELL **96**(7): 479-498.
- BAKHEET, T., M. FREVEL, ET AL. (2001). "ARED: HUMAN AU-RICH ELEMENT-CONTAINING mRNA DATABASE REVEALS AN UNEXPECTEDLY DIVERSE FUNCTIONAL REPERTOIRE OF ENCODED PROTEINS." NUCLEIC ACIDS RESEARCH **29**(1): 246-254.
- BAKHEET, T., B. R. G. WILLIAMS, ET AL. (2003). "ARED 2.0: AN UPDATE OF AU-RICH ELEMENT mRNA DATABASE." NUCLEIC ACIDS RESEARCH **31**(1): 421-423.
- BAKHEET, T., B. R. G. WILLIAMS, ET AL. (2006). "ARED 3.0: THE LARGE AND DIVERSE AU-RICH TRANSCRIPTOME." NUCLEIC ACIDS RESEARCH **34**(SUPPL 1): D111-D114.
- BALAGOPAL, V. AND R. PARKER (2009). "POLYSOMES, P BODIES AND STRESS GRANULES: STATES AND FATES OF EUKARYOTIC MRNAs." CURR OPIN CELL BIOL **21**(3): 403-8.
- BARBISAN, F., R. MAZZUCHELLI, ET AL. (2009). "OVEREXPRESSION OF ELAV-LIKE PROTEIN HUR IS ASSOCIATED WITH INCREASED COX-2 EXPRESSION IN ATROPHY, HIGH-GRADE PROSTATIC INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA, AND INCIDENTAL

- PROSTATE CANCER IN CYSTOPROSTATECTOMIES." EUROPEAN UROLOGY **56(1)**: 105-112.
- BARREAU, C., L. PAILLARD, ET AL. (2005). "AU-RICH ELEMENTS AND ASSOCIATED FACTORS: ARE THERE UNIFYING PRINCIPLES?" NUCLEIC ACIDS RESEARCH **33(22)**: 7138-7150.
- BECK, C., H. SCHREIBER, ET AL. (2001). "ROLE OF TGF-B IN IMMUNE-EVASION OF CANCER." MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE **52(4)**: 387-395.
- BENJAMIN, D. AND C. MORONI (2007). "MRNA STABILITY AND CANCER: AN EMERGING LINK?" EXPERT OPIN BIOL THER **7(10)**: 1515-29.
- BHATTACHARYYA, S. N., R. HABERMACHER, ET AL. (2006). "RELIEF OF MICRORNA-MEDIATED TRANSLATIONAL REPRESSION IN HUMAN CELLS SUBJECTED TO STRESS." CELL **125(6)**: 1111-1124.
- BLANC JF, L. S., BALABAUD C, BIOULAC-SAGE P (2002). "HISTOPHYSIOLOGIE HÉPATIQUE." ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGIE **7-005-A-010**.
- BLUM, J. L., A. M. SAMAREL, ET AL. (2005). "PHOSPHORYLATION AND BINDING OF AUF1 TO THE 3'-UNTRANSLATED REGION OF CARDIOMYOCYTE SERCA2A MRNA." AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL **289(6)**: H2543-2550.
- BOYAULT, S., D. S. RICKMAN, ET AL. (2007). "TRANSCRIPTOME CLASSIFICATION OF HCC IS RELATED TO GENE ALTERATIONS AND TO NEW THERAPEUTIC TARGETS." HEPATOLOGY **45(1)**: 42-52.
- CALALUCE, R., M. M. GUBIN, ET AL. (2010). "THE RNA BINDING PROTEIN HUR DIFFERENTIALLY REGULATES UNIQUE SUBSETS OF MRNAs IN ESTROGEN RECEPTOR NEGATIVE AND ESTROGEN RECEPTOR POSITIVE BREAST CANCER." BMC CANCER **10**: 126.
- CALLE, E. E., C. RODRIGUEZ, ET AL. (2003). "OVERWEIGHT, OBESITY, AND MORTALITY FROM CANCER IN A PROSPECTIVELY STUDIED COHORT OF U.S. ADULTS." N ENGL J MED **348(17)**: 1625-1638.
- CAPURRO, M., I. R. WANLESS, ET AL. (2003). "GLYPICAN-3: A NOVEL SERUM AND HISTOCHEMICAL MARKER FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA." GASTROENTEROLOGY **125(1)**: 89-97.
- CHANG, T.-C., A. YAMASHITA, ET AL. (2004). "UNR, A NEW PARTNER OF POLY(A)-BINDING PROTEIN, PLAYS A KEY ROLE IN TRANSLATIONALLY COUPLED MRNA TURNOVER MEDIATED BY THE C-FOS MAJOR CODING-REGION DETERMINANT." GENES & DEVELOPMENT **18(16)**: 2010-2023.
- CHATTERJEE, S. AND J. K. PAL (2009). "ROLE OF 5'- AND 3'-UNTRANSLATED REGIONS OF MRNAs IN HUMAN DISEASES." BIOL CELL **101(5)**: 251-62.
- CHEN, C.-Y. A., N. XU, ET AL. (2004). "FUNCTIONAL DISSECTION OF HNRNP D SUGGESTS THAT NUCLEAR IMPORT IS REQUIRED BEFORE HNRNP D CAN MODULATE MRNA TURNOVER IN THE CYTOPLASM." RNA **10(4)**: 669-680.
- CHEN, M. AND J. L. MANLEY (2009). "MECHANISMS OF ALTERNATIVE SPLICING REGULATION: INSIGHTS FROM MOLECULAR AND GENOMICS APPROACHES." NAT REV MOL CELL BIOL **10(11)**: 741-754.

- CHEN, X., S. T. CHEUNG, ET AL. (2002). "GENE EXPRESSION PATTERNS IN HUMAN LIVER CANCERS." MOL BIOL CELL **13**(6): 1929-39.
- CHENDRIMADA, T. P., K. J. FINN, ET AL. (2007). "MICRORNA SILENCING THROUGH RISC RECRUITMENT OF EIF6." NATURE **447**(7146): 823-8.
- CHO, N. P., H. S. HAN, ET AL. (2007). "OVEREXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE-2 CORRELATES WITH CYTOPLASMIC HuR EXPRESSION IN SALIVARY MUCOEPIDERMAL CARCINOMA BUT NOT IN PLEOMORPHIC ADENOMA." JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE **36**(5): 297-303.
- CONTI, E. AND E. IZAURRALDE (2005). "NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY: MOLECULAR INSIGHTS AND MECHANISTIC VARIATIONS ACROSS SPECIES." CURR OPIN CELL BIOL **17**(3): 316-25.
- COWLING, V. H. (2009). "REGULATION OF mRNA CAP METHYLATION." BIOCHEMICAL JOURNAL **425**(2): 295-302.
- DAVID, P. S., R. TANVEER, ET AL. (2007). "FRET-DETECTABLE INTERACTIONS BETWEEN THE ARE BINDING PROTEINS, HuR AND P37AUF1." RNA **13**(9): 1453-68.
- DELPUECH, O., J. B. TRABUT, ET AL. (2002). "IDENTIFICATION, USING cDNA MACROARRAY ANALYSIS, OF DISTINCT GENE EXPRESSION PROFILES ASSOCIATED WITH PATHOLOGICAL AND VIROLOGICAL FEATURES OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA." ONCOGENE **21**(18): 2926-37.
- DEMBER, L. M., N. D. KIM, ET AL. (1996). "INDIVIDUAL RNA RECOGNITION MOTIFS OF TIA-1 AND TIAR HAVE DIFFERENT RNA BINDING SPECIFICITIES." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **271**(5): 2783-2788.
- DENKERT, C., I. KOCH, ET AL. (2006). "EXPRESSION OF THE ELAV-LIKE PROTEIN HuR IN HUMAN COLON CANCER: ASSOCIATION WITH TUMOR STAGE AND CYCLOOXYGENASE-2." MOD PATHOL **19**(9): 1261-1269.
- DENKERT, C., W. WEICHERT, ET AL. (2004). "OVEREXPRESSION OF THE EMBRYONIC-LETHAL ABNORMAL VISION-LIKE PROTEIN HuR IN OVARIAN CARCINOMA IS A PROGNOSTIC FACTOR AND IS ASSOCIATED WITH INCREASED CYCLOOXYGENASE 2 EXPRESSION." CANCER RESEARCH **64**(1): 189-195.
- DIEDERICH, S. AND D. A. HABER (2007). "DUAL ROLE FOR ARGONAUTES IN MICRORNA PROCESSING AND POSTTRANSCRIPTIONAL REGULATION OF MICRORNA EXPRESSION." CELL **131**(6): 1097-1108.
- DOBI, A., M. SZEMES, ET AL. (2006). "AUF1 IS EXPRESSED IN THE DEVELOPING BRAIN, BINDS TO AT-RICH DOUBLE-STRANDED DNA, AND REGULATES ENKEPHALIN GENE EXPRESSION." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **281**(39): 28889-28900.
- DOLLER, A., J. PFEILSCHIFTER, ET AL. (2008). "SIGNALLING PATHWAYS REGULATING NUCLEO-CYTOPLASMIC SHUTTLING OF THE mRNA-BINDING PROTEIN HuR." CELLULAR SIGNALLING **20**(12): 2165-2173.
- DOMA, M. K. AND R. PARKER (2006). "ENDONUCLEOLYTIC CLEAVAGE OF EUKARYOTIC MRNAs WITH STALLS IN TRANSLATION ELONGATION." NATURE **440**(7083): 561-4.

- DONATO, F., A. TAGGER, ET AL. (2002). "ALCOHOL AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA: THE EFFECT OF LIFETIME INTAKE AND HEPATITIS VIRUS INFECTIONS IN MEN AND WOMEN." AM. J. EPIDEMIOL. **155**(4): 323-331.
- DONG, R., J.-G. LU, ET AL. (2007). "STABILIZATION OF SNAIL BY HUR IN THE PROCESS OF HYDROGEN PEROXIDE INDUCED CELL MIGRATION." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS **356**(1): 318-321.
- DOYLE, G. A. R., P. F. LEEDS, ET AL. (1998). "THE C-MYC CODING REGION DETERMINANT-BINDING PROTEIN: A MEMBER OF A FAMILY OF KH DOMAIN RNA-BINDING PROTEINS." NUCL. ACIDS RES. **26**(22): 5036-5044.
- EBERLE, A. B., S. LYKKE-ANDERSEN, ET AL. (2009). "SMG6 PROMOTES ENDONUCLEOLYTIC CLEAVAGE OF NONSENSE mRNA IN HUMAN CELLS." NAT STRUCT MOL BIOL **16**(1): 49-55.
- EL-SERAG, H. B., P. A. RICHARDSON, ET AL. (2001). "THE ROLE OF DIABETES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA: A CASE-CONTROL STUDY AMONG UNITED STATES VETERANS." AM J GASTROENTEROL **96**(8): 2462-2467.
- EL-SERAG, H. B. AND K. L. RUDOLPH (2007). "HEPATOCELLULAR CARCINOMA: EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CARCINOGENESIS." GASTROENTEROLOGY **132**(7): 2557-76.
- ERKINHEIMO, T.-L., H. LASSUS, ET AL. (2003). "CYTOPLASMIC HUR EXPRESSION CORRELATES WITH POOR OUTCOME AND WITH CYCLOOXYGENASE 2 EXPRESSION IN SEROUS OVARIAN CARCINOMA." CANCER RESEARCH **63**(22): 7591-7594.
- FABIAN, M. R., N. SONENBERG, ET AL. (2010). "REGULATION OF mRNA TRANSLATION AND STABILITY BY MICRORNAs." ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY **79**(1): 351-379.
- FARAZI, P. A. AND R. A. DEPINHO (2006). "HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATHOGENESIS: FROM GENES TO ENVIRONMENT." NAT REV CANCER **6**(9): 674-687.
- FIALCOWITZ-WHITE, E. J., B. Y. BREWER, ET AL. (2007). "SPECIFIC PROTEIN DOMAINS MEDIATE COOPERATIVE ASSEMBLY OF HUR OLIGOMERS ON AU-RICH mRNA-DESTABILIZING SEQUENCES." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **282**(29): 20948-20959.
- FILIPOWICZ, W., S. N. BHATTACHARYYA, ET AL. (2008). "MECHANISMS OF POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION BY MICRORNAs: ARE THE ANSWERS IN SIGHT?" NAT REV GENET **9**(2): 102-114.
- FITZGERALD, K. D. AND B. L. SEMLER (2009). "BRIDGING IRES ELEMENTS IN MRNAS TO THE EUKARYOTIC TRANSLATION APPARATUS." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENE REGULATORY MECHANISMS **1789**(9-10): 518-528.
- FÖRCH, P. AND J. VALCÁRCEL (2001). "MOLECULAR MECHANISMS OF GENE EXPRESSION REGULATION BY THE APOPTOSIS-PROMOTING PROTEIN TIA-1." APOPTOSIS **6**(6): 463-468.
- FRANCESCO, D., B. PAOLO, ET AL. (1998). "A META-ANALYSIS OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON THE COMBINED EFFECT OF HEPATITIS B AND C VIRUS INFECTIONS IN

- CAUSING HEPATOCELLULAR CARCINOMA." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER **75**(3): 347-354.
- FRIEDMAN, R. C., K. K.-H. FARH, ET AL. (2009). "MOST MAMMALIAN MRNAs ARE CONSERVED TARGETS OF MICRORNAs." GENOME RESEARCH **19**(1): 92-105.
- FRISCHMEYER, P. A., A. VAN HOOF, ET AL. (2002). "AN mRNA SURVEILLANCE MECHANISM THAT ELIMINATES TRANSCRIPTS LACKING TERMINATION CODONS." SCIENCE **295**(5563): 2258-61.
- GALBAN, S., Y. KUWANO, ET AL. (2008). "RNA-BINDING PROTEINS HuR AND PTB PROMOTE THE TRANSLATION OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1ALPHA." MOL CELL BIOL **28**(1): 93-107.
- GARNEAU, N. L., J. WILUSZ, ET AL. (2007). "THE HIGHWAYS AND BYWAYS OF mRNA DECAY." NAT REV MOL CELL BIOL **8**(2): 113-126.
- GEBAUER, F. AND M. W. HENTZE (2004). "MOLECULAR MECHANISMS OF TRANSLATIONAL CONTROL." NAT REV MOL CELL BIOL **5**(10): 827-835.
- GOOD, P. J. (1995). "A CONSERVED FAMILY OF ELAV-LIKE GENES IN VERTEBRATES." PROC NATL ACAD SCI USA **92**(10): 4557-61.
- GRABER, T. E. AND M. HOLCIK (2007). "CAP-INDEPENDENT REGULATION OF GENE EXPRESSION IN APOPTOSIS." MOL BIOSYST **3**(12): 825-34.
- GRAVEEL, C. R., T. JATKOE, ET AL. (2001). "EXPRESSION PROFILING AND IDENTIFICATION OF NOVEL GENES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMAS." ONCOGENE **20**(21): 2704-12.
- GRIMSON, A., K. K.-H. FARH, ET AL. (2007). "MICRORNA TARGETING SPECIFICITY IN MAMMALS: DETERMINANTS BEYOND SEED PAIRING." MOLECULAR CELL **27**(1): 91-105.
- GROSSET, C., C.-Y. A. CHEN, ET AL. (2000). "A MECHANISM FOR TRANSLATIONALLY COUPLED mRNA TURNOVER: INTERACTION BETWEEN THE POLY(A) TAIL AND A C-FOS RNA CODING DETERMINANT VIA A PROTEIN COMPLEX." CELL **103**(1): 29-40.
- GU, M. AND C. D. LIMA (2005). "PROCESSING THE MESSAGE: STRUCTURAL INSIGHTS INTO CAPPING AND DECAPPING mRNA." CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY **15**(1): 99-106.
- GUHANIYOGI, J. AND G. BREWER (2001). "REGULATION OF mRNA STABILITY IN MAMMALIAN CELLS." GENE **265**(1-2): 11-23.
- GUO, X. AND R. S. HARTLEY (2006). "HuR CONTRIBUTES TO CYCLIN E1 DEREGLATION IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS." CANCER RES **66**(16): 7948-56.
- GUO, X., Y. WU, ET AL. (2010). "COLD-INDUCIBLE RNA-BINDING PROTEIN CONTRIBUTES TO HUMAN ANTIGEN R AND CYCLIN E1 DEREGLATION IN BREAST CANCER." MOL CARCINO **49**(2): 130-40.
- HAYASHI, K., T. KUROHJI, ET AL. (1997). "LOCALIZATION OF THROMBOSPONDIN IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA." HEPATOLOGY **25**(3): 569-74.

- HEINONEN, M., P. BONO, ET AL. (2005). "CYTOPLASMIC HuR EXPRESSION IS A PROGNOSTIC FACTOR IN INVASIVE DUCTAL BREAST CARCINOMA." CANCER RESEARCH **65**(6): 2157-2161.
- HEINONEN, M., R. FAGERHOLM, ET AL. (2007). "PROGNOSTIC ROLE OF HuR IN HEREDITARY BREAST CANCER." CLINICAL CANCER RESEARCH **13**(23): 6959-6963.
- HILLMAN, R. T., R. E. GREEN, ET AL. (2004). "AN UNAPPRECIATED ROLE FOR RNA SURVEILLANCE." GENOME BIOL **5**(2): R8.
- HINMAN, M. AND H. LOU (2008). "DIVERSE MOLECULAR FUNCTIONS OF HU PROTEINS." CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES **65**(20): 3168-3181.
- HOLCIK, M. AND N. SONENBERG (2005). "TRANSLATIONAL CONTROL IN STRESS AND APOPTOSIS." NAT REV MOL CELL BIOL **6**(4): 318-327.
- HUMPHREYS, D. T., B. J. WESTMAN, ET AL. (2005). "MICRORNAs CONTROL TRANSLATION INITIATION BY INHIBITING EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E/CAP AND POLY(A) TAIL FUNCTION." PROC NATL ACAD SCI USA **102**(47): 16961-6.
- HUWILER, A., E.-S. AKOOL, ET AL. (2003). "ATP POTENTIATES INTERLEUKIN-1 β -INDUCED MMP-9 EXPRESSION IN MESANGIAL CELLS VIA RECRUITMENT OF THE ELAV PROTEIN HuR." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **278**(51): 51758-51769.
- IZQUIERDO, J. M. (2008). "HU ANTIGEN R (HuR) FUNCTIONS AS AN ALTERNATIVE PRE-MRNA SPLICING REGULATOR OF FAS APOPTOSIS-PROMOTING RECEPTOR ON EXON DEFINITION." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **283**(27): 19077-19084.
- JACKSON, R. J., C. U. T. HELLEN, ET AL. (2010). "THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION." NAT REV MOL CELL BIOL **11**(2): 113-127.
- KEDERSHA, N. AND P. ANDERSON (2002). "STRESS GRANULES: SITES OF mRNA TRIAGE THAT REGULATE mRNA STABILITY AND TRANSLATABILITY." BIOCHEM SOC TRANS **30**(PT 6): 963-9.
- KEDERSHA, N. L., M. GUPTA, ET AL. (1999). "RNA-BINDING PROTEINS TIA-1 AND TIAR LINK THE PHOSPHORYLATION OF EIF-2 β TO THE ASSEMBLY OF MAMMALIAN STRESS GRANULES." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY **147**(7): 1431-1442.
- KEREN, H., G. LEV-MAOR, ET AL. (2010). "ALTERNATIVE SPLICING AND EVOLUTION: DIVERSIFICATION, EXON DEFINITION AND FUNCTION." NAT REV GENET **11**(5): 345-355.
- KIM, H. H., Y. KUWANO, ET AL. (2009). "HuR RECRUITS LET-7/RISC TO REPRESS C-MYC EXPRESSION." GENES & DEVELOPMENT **23**(15): 1743-1748.
- KIM, V. N., J. HAN, ET AL. (2009). "BIOGENESIS OF SMALL RNAs IN ANIMALS." NAT REV MOL CELL BIOL **10**(2): 126-139.
- KROL, J., I. LOEDIGE, ET AL. (2010). "THE WIDESPREAD REGULATION OF MICRORNA BIOGENESIS, FUNCTION AND DECAY." NAT REV GENET **11**(9): 597-610.
- KUHN, U., M. GUNDEL, ET AL. (2009). "POLY(A) TAIL LENGTH IS CONTROLLED BY THE NUCLEAR POLY(A)-BINDING PROTEIN REGULATING THE INTERACTION BETWEEN

- POLY(A) POLYMERASE AND THE CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR." J BIOL CHEM **284**(34): 22803-14.
- KULLMANN, M., U. GÖPFERT, ET AL. (2002). "ELAV/HU PROTEINS INHIBIT P27 TRANSLATION VIA AN IRES ELEMENT IN THE P27 5'UTR." GENES & DEVELOPMENT **16**(23): 3087-3099.
- KUWANO, Y., H. H. KIM, ET AL. (2008). "MKP-1 mRNA STABILIZATION AND TRANSLATIONAL CONTROL BY RNA-BINDING PROTEINS HUR AND NF90." MOL. CELL. BIOL. **28**(14): 4562-4575.
- LADEIRO, Y., G. COUCHY, ET AL. (2008). "MICRORNA PROFILING IN HEPATOCELLULAR TUMORS IS ASSOCIATED WITH CLINICAL FEATURES AND ONCOGENE/TUMOR SUPPRESSOR GENE MUTATIONS." HEPATOLOGY **47**(6): 1955-63.
- LAGIOU, P., H. KUPER, ET AL. (2000). "ROLE OF DIABETES MELLITUS IN THE ETIOLOGY OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA." J. NATL. CANCER INST. **92**(13): 1096-1099.
- LAL, A., K. MAZAN-MAMCZARZ, ET AL. (2004). "CONCURRENT VERSUS INDIVIDUAL BINDING OF HUR AND AUF1 TO COMMON LABILE TARGET MRNAs." EMBO J **23**(15): 3092-3102.
- LAURENT-PUIG, P., P. LEGOIX, ET AL. (2001). "GENETIC ALTERATIONS ASSOCIATED WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMAS DEFINE DISTINCT PATHWAYS OF HEPATOCARCINOGENESIS." GASTROENTEROLOGY **120**(7): 1763-1773.
- LEE, J. S. AND S. S. THORGEIRSSON (2002). "FUNCTIONAL AND GENOMIC IMPLICATIONS OF GLOBAL GENE EXPRESSION PROFILES IN CELL LINES FROM HUMAN HEPATOCELLULAR CANCER." HEPATOLOGY **35**(5): 1134-43.
- LEJEUNE, F., X. LI, ET AL. (2003). "NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY IN MAMMALIAN CELLS INVOLVES DECAPPING, DEADENYLATING, AND EXONUCLEOLYTIC ACTIVITIES." MOLECULAR CELL **12**(3): 675-687.
- LEVANON, E. Y., E. EISENBERG, ET AL. (2004). "SYSTEMATIC IDENTIFICATION OF ABUNDANT A-TO-I EDITING SITES IN THE HUMAN TRANSCRIPTOME." NAT. BIOTECHNOL. **22**: 1001.
- LEVY, N. S., S. CHUNG, ET AL. (1998). "HYPOXIC STABILIZATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR mRNA BY THE RNA-BINDING PROTEIN HUR." J BIOL CHEM **273**(11): 6417-23.
- LIAO, B., Y. HU, ET AL. (2007). "COMPETITIVE BINDING OF AUF1 AND TIAR TO MYC mRNA CONTROLS ITS TRANSLATION." NAT STRUCT MOL BIOL **14**(6): 511-518.
- LOPEZ-LASTRA, M., A. RIVAS, ET AL. (2005). "PROTEIN SYNTHESIS IN EUKARYOTES: THE GROWING BIOLOGICAL RELEVANCE OF CAP-INDEPENDENT TRANSLATION INITIATION." BIOL RES **38**(2-3): 121-46.
- LOPEZ DE SILANES, I., J. FAN, ET AL. (2003). "ROLE OF THE RNA-BINDING PROTEIN HUR IN COLON CARCINOGENESIS." ONCOGENE **22**(46): 7146-7154.
- LOPEZ DE SILANES, I., A. LAL, ET AL. (2005). "HUR: POST-TRANSCRIPTIONAL PATHS TO MALIGNANCY." RNA BIOL **2**(1): 11-3.

- LOPEZ DE SILANES, I., M. P. QUESADA, ET AL. (2007). "ABERRANT REGULATION OF MESSENGER RNA 3'-UNTRANSLATED REGION IN HUMAN CANCER." CELL ONCOL **29**(1): 1-17.
- LOPEZ DE SILANES, I., M. ZHAN, ET AL. (2004). "IDENTIFICATION OF A TARGET RNA MOTIF FOR RNA-BINDING PROTEIN HUR." PROC NATL ACAD SCI U S A **101**(9): 2987-92.
- MANGUS, D. A., M. C. EVANS, ET AL. (2003). "POLY(A)-BINDING PROTEINS: MULTIFUNCTIONAL SCAFFOLDS FOR THE POST-TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF GENE EXPRESSION." GENOME BIOL **4**(7): 223.
- MASUDA, K., K. ABDELMOHSEN, ET AL. (2009). "RNA-BINDING PROTEINS IMPLICATED IN THE HYPOXIC RESPONSE." JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE **13**(9A): 2759-2769.
- MATHONNET, G., M. R. FABIAN, ET AL. (2007). "MICRORNA INHIBITION OF TRANSLATION INITIATION IN VITRO BY TARGETING THE CAP-BINDING COMPLEX EIF4F." SCIENCE **317**(5845): 1764-7.
- MAZAN-MAMCZARZ, K., P. R. HAGNER, ET AL. (2008). "POST-TRANSCRIPTIONAL GENE REGULATION BY HUR PROMOTES A MORE TUMORIGENIC PHENOTYPE." ONCOGENE **27**(47): 6151-63.
- MAZAN-MAMCZARZ, K., Y. KUWANO, ET AL. (2009). "IDENTIFICATION OF A SIGNATURE MOTIF IN TARGET MRNAS OF RNA-BINDING PROTEIN AUF1." NUCLEIC ACIDS RESEARCH **37**(1): 204-214.
- MAZAR, A. P. (2008). "UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR RECEPTOR CHOREOGRAPHS MULTIPLE LIGAND INTERACTIONS: IMPLICATIONS FOR TUMOR PROGRESSION AND THERAPY." CLINICAL CANCER RESEARCH **14**(18): 5649-5655.
- MEI, C., L. SUN, ET AL. (2010). "TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF DNA METHYLTRANSFERASE 3B IS REGULATED BY PHOSPHATIDYLINOSITOL 3 KINASE/AKT PATHWAY IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINES." CELL BIOCHEM **111**(1): 158-67.
- MEISNER, N. C., M. HINTERSTEINER, ET AL. (2007). "IDENTIFICATION AND MECHANISTIC CHARACTERIZATION OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT INHIBITORS FOR HUR." NAT CHEM BIOL **3**(8): 508-15.
- MENDELL, J. T., N. A. SHARIFI, ET AL. (2004). "NONSENSE SURVEILLANCE REGULATES EXPRESSION OF DIVERSE CLASSES OF MAMMALIAN TRANSCRIPTS AND MUTES GENOMIC NOISE." NAT GENET **36**(10): 1073-8.
- MIDORIKAWA, Y., S. ISHIKAWA, ET AL. (2003). "GLYPICAN-3, OVEREXPRESSED IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA, MODULATES FGF2 AND BMP-7 SIGNALING." INT J CANCER **103**(4): 455-65.
- MILL, S. AND J. A. STEITZ (2004). "EVIDENCE FOR REASSOCIATION OF RNA-BINDING PROTEINS AFTER CELL LYSIS: IMPLICATIONS FOR THE INTERPRETATION OF IMMUNOPRECIPITATION ANALYSES." RNA **10**(11): 1692-4.

- MØLLER, H., A. MELLEMGAAARD, ET AL. (1994). "OBESITY AND CANCER RISK: A DANISH RECORD-LINKAGE STUDY." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER **30**(3): 344-350.
- MOORE, M. J. (2005). "FROM BIRTH TO DEATH: THE COMPLEX LIVES OF EUKARYOTIC MRNAs." SCIENCE **309**(5740): 1514-8.
- MORGAN, T. R., S. MANDAYAM, ET AL. (2004). "ALCOHOL AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA." GASTROENTEROLOGY **127**(5, SUPPLEMENT 1): S87-S96.
- MRENA, J., J.-P. WIKSTEN, ET AL. (2005). "CYCLOOXYGENASE-2 IS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR IN GASTRIC CANCER AND ITS EXPRESSION IS REGULATED BY THE MESSENGER RNA STABILITY FACTOR HUR." CLINICAL CANCER RESEARCH **11**(20): 7362-7368.
- NABORS, L. B., G. Y. GILLESPIE, ET AL. (2001). "HUR, A RNA STABILITY FACTOR, IS EXPRESSED IN MALIGNANT BRAIN TUMORS AND BINDS TO ADENINE- AND URIDINE-RICH ELEMENTS WITHIN THE 3' UNTRANSLATED REGIONS OF CYTOKINE AND ANGIOGENIC FACTOR MRNAs." CANCER RESEARCH **61**(5): 2154-2161.
- NAGAI, M. A., J. H. FREGNANI, ET AL. (2007). "DOWN-REGULATION OF PHLDA1 GENE EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH BREAST CANCER PROGRESSION." BREAST CANCER RES TREAT **106**(1): 49-56.
- NEEF, R., M. A. KUSKE, ET AL. (2002). "IDENTIFICATION OF THE HUMAN PHLDA1/TDAG51 GENE: DOWN-REGULATION IN METASTATIC MELANOMA CONTRIBUTES TO APOPTOSIS RESISTANCE AND GROWTH DEREGLATION." CANCER RES **62**(20): 5920-9.
- NGUYEN-CHI, M. AND D. MORELLO (2008). "[ABERRANT REGULATION OF mRNA 3' UNTRANSLATED REGION IN CANCERS AND INFLAMMATION]." MED SCI (PARIS) **24**(3): 290-6.
- NIESPOREK, S., G. KRISTIANSEN, ET AL. (2008). "EXPRESSION OF THE ELAV-LIKE PROTEIN HUR IN HUMAN PROSTATE CARCINOMA IS AN INDICATOR OF DISEASE RELAPSE AND LINKED TO COX-2 EXPRESSION." INT J ONCOL **32**(2): 341-7.
- NILSEN, T. W. AND B. R. GRAVELEY (2010). "EXPANSION OF THE EUKARYOTIC PROTEOME BY ALTERNATIVE SPLICING." NATURE **463**(7280): 457-463.
- NISHIKURA, K. (2010). "FUNCTIONS AND REGULATION OF RNA EDITING BY ADAR DEAMINASES." ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY **79**(1): 321-349.
- OH, S. W., Y. S. YOON, ET AL. (2005). "EFFECTS OF EXCESS WEIGHT ON CANCER INCIDENCES DEPENDING ON CANCER SITES AND HISTOLOGIC FINDINGS AMONG MEN: KOREA NATIONAL HEALTH INSURANCE CORPORATION STUDY." J CLIN ONCOL **23**(21): 4742-4754.
- PANG, R., E. TSE, ET AL. (2006). "MOLECULAR PATHWAYS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA." CANCER LETTERS **240**(2): 157-169.
- PANTOPOULOS, K. (2004). "IRON METABOLISM AND THE IRE/IRP REGULATORY SYSTEM: AN UPDATE." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES **1012**(1): 1-13.

- PARENT, A. AND M. BISAILLON (2006). "[SYNERGY BETWEEN TRANSCRIPTION AND MRNA PROCESSING EVENTS]." MED SCI (PARIS) **22**(6-7): 626-32.
- PARK, C. G., S. Y. LEE, ET AL. (1996). "A NOVEL GENE PRODUCT THAT COUPLES TCR SIGNALING TO FAS(CD95) EXPRESSION IN ACTIVATION-INDUCED CELL DEATH." IMMUNITY **4**(6): 583-91.
- PARKER, R. AND H. SONG (2004). "THE ENZYMES AND CONTROL OF EUKARYOTIC MRNA TURNOVER." NAT STRUCT MOL BIOL **11**(2): 121-127.
- PEINADO, H., D. OLMEDA, ET AL. (2007). "SNAIL, ZEB AND BHLH FACTORS IN TUMOUR PROGRESSION: AN ALLIANCE AGAINST THE EPITHELIAL PHENOTYPE?" NAT REV CANCER **7**(6): 415-428.
- POON, R. T., K. K. CHUNG, ET AL. (2004). "CLINICAL SIGNIFICANCE OF THROMBOSPONDIN 1 EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA." CLIN CANCER RES **10**(12 Pt 1): 4150-7.
- PROUDFOOT, N. J., A. FURGER, ET AL. (2002). "INTEGRATING MRNA PROCESSING WITH TRANSCRIPTION." CELL **108**(4): 501-512.
- PULLMANN, R., JR., H. H. KIM, ET AL. (2007). "ANALYSIS OF TURNOVER AND TRANSLATION REGULATORY RNA-BINDING PROTEIN EXPRESSION THROUGH BINDING TO COGNATE MRNAS." MOL CELL BIOL **27**(18): 6265-78.
- QIAN, G. S., R. K. ROSS, ET AL. (1994). "A FOLLOW-UP STUDY OF URINARY MARKERS OF AFLATOXIN EXPOSURE AND LIVER CANCER RISK IN SHANGHAI, PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA." CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION **3**(1): 3-10.
- RAINERI, I., D. WEGMUELLER, ET AL. (2004). "ROLES OF AUF1 ISOFORMS, HU Ψ R AND BRP1 IN ARE Ψ DEPENDENT MRNA TURNOVER STUDIED BY RNA INTERFERENCE." NUCLEIC ACIDS RESEARCH **32**(4): 1279-1288.
- ROSS, J. (1995). "MRNA STABILITY IN MAMMALIAN CELLS." MICROBIOL REV **59**(3): 423-50.
- RUETER, S. M., T. R. DAWSON, ET AL. (1999). "REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING BY RNA EDITING." NATURE **399**(6731): 75-80.
- SAMIR, Z. AND L. TING-KAI (2007). "DETERMINANTS OF ALCOHOL USE AND ABUSE: IMPACT OF QUANTITY AND FREQUENCY PATTERNS ON LIVER DISEASE." HEPATOLOGY **46**(6): 2032-2039.
- SARGIANNIDOU, I., J. ZHOU, ET AL. (2001). "THE ROLE OF THROMBOSPONDIN-1 IN TUMOR PROGRESSION." EXP BIOL MED (MAYWOOD) **226**(8): 726-33.
- SARKAR, B., J.-Y. LU, ET AL. (2003). "NUCLEAR IMPORT AND EXPORT FUNCTIONS IN THE DIFFERENT ISOFORMS OF THE AUF1/HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN PROTEIN FAMILY." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **278**(23): 20700-20707.
- SEEBURG, P. H., M. HIGUCHI, ET AL. (1998). "RNA EDITING OF BRAIN GLUTAMATE RECEPTOR CHANNELS: MECHANISM AND PHYSIOLOGY." BRAIN RES BRAIN RES REV **26**(2-3): 217-29.

- SEMENZA, G. L. (2000). "HIF-1: MEDIATOR OF PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL RESPONSES TO HYPOXIA." J APPL PHYSIOL **88**(4): 1474-80.
- SHEFLIN, L. G., A. P. ZOU, ET AL. (2004). "ANDROGENS REGULATE THE BINDING OF ENDOGENOUS HUR TO THE AU-RICH 3'UTRS OF HIF-1ALPHA AND EGF mRNA." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN **322**(2): 644-51.
- SPARANESE, D. AND C. H. LEE (2007). "CRD-BP SHIELDS C-MYC AND MDR-1 RNA FROM ENDONUCLEOLYTIC ATTACK BY A MAMMALIAN ENDORIBONUCLEASE." NUCL. ACIDS RES. **35**(4): 1209-1221.
- SRISAWAT, C. AND D. R. ENGELKE (2001). "STREPTAVIDIN APTAMERS: AFFINITY TAGS FOR THE STUDY OF RNAs AND RIBONUCLEOPROTEINS." RNA **7**(4): 632-41.
- STARLEY, B. Q., C. J. CALCAGNO, ET AL. (2010). "NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA: A WEIGHTY CONNECTION." HEPATOLOGY **51**(5): 1820-1832.
- SU, W. H., C. C. CHAO, ET AL. (2007). "ONCODB.HCC: AN INTEGRATED ONCOGENOMIC DATABASE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA REVEALED ABERRANT CANCER TARGET GENES AND LOCI." NUCLEIC ACIDS RES **35**(DATABASE ISSUE): D727-31.
- THOMAS, J. D. AND G. J. JOHANNES (2007). "IDENTIFICATION OF MRNAs THAT CONTINUE TO ASSOCIATE WITH POLYSOMES DURING HYPOXIA." RNA **13**(7): 1116-31.
- TOLNAY, M., J. D. LAMBRIS, ET AL. (1997). "TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE COMPLEMENT RECEPTOR 2 GENE: ROLE OF A HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN." JIMMUNOL **159**(11): 5492-501.
- TRAN, H., F. MAURER, ET AL. (2003). "STABILIZATION OF UROKINASE AND UROKINASE RECEPTOR MRNAs BY HUR IS LINKED TO ITS CYTOPLASMIC ACCUMULATION INDUCED BY ACTIVATED MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE-ACTIVATED PROTEIN KINASE 2." MOL. CELL. BIOL. **23**(20): 7177-7188.
- TSAI, W. L. AND R. T. CHUNG (2010). "VIRAL HEPATOCARCINOGENESIS." ONCOGENE **29**(16): 2309-2324.
- VAN DEN HEUVEL, S. (2005). "CELL-CYCLE REGULATION." WORMBOOK: 1-16.
- VAN HOOF, A., P. A. FRISCHMEYER, ET AL. (2002). "EXOSOME-MEDIATED RECOGNITION AND DEGRADATION OF MRNAs LACKING A TERMINATION CODON." SCIENCE **295**(5563): 2262-4.
- VATTEM, K. M. AND R. C. WEK (2004). "REINITIATION INVOLVING UPSTREAM ORFS REGULATES ATF4 mRNA TRANSLATION IN MAMMALIAN CELLS." PROC NATL ACAD SCI USA **101**(31): 11269-74.
- VAZQUEZ-CHANTADA, M., D. FERNANDEZ-RAMOS, ET AL. (2010). "HUR/METHYL-HUR AND AUF1 REGULATE THE MAT EXPRESSED DURING LIVER PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, AND CARCINOGENESIS." GASTROENTEROLOGY **138**(5): 1943-53.
- WANG, J., W. ZHAO, ET AL. (2009). "THE EXPRESSION OF RNA-BINDING PROTEIN HUR IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER CORRELATES WITH VASCULAR ENDOTHELIAL

- GROWTH FACTOR-C EXPRESSION AND LYMPH NODE METASTASIS." ONCOLOGY **76(6)**: 420-9.
- WANG, W., M. C. CALDWELL, ET AL. (2000). "HU Ψ R REGULATES CYCLIN A AND CYCLIN B1 mRNA STABILITY DURING CELL PROLIFERATION." EMBO J **19(10)**: 2340-50.
- WANG, X. AND Y. LIU (2007). "REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE BY MAP KINASE PHOSPHATASE-1." CELLULAR SIGNALLING **19(7)**: 1372-1382.
- WANG, X. AND T. M. TANAKA HALL (2001). "STRUCTURAL BASIS FOR RECOGNITION OF AU-RICH ELEMENT RNA BY THE HUD PROTEIN." NAT STRUCT MOL BIOL **8(2)**: 141-145.
- WATNICK, R. S., Y. N. CHENG, ET AL. (2003). "RAS MODULATES MYC ACTIVITY TO REPRESS THROMBOSPONDIN-1 EXPRESSION AND INCREASE TUMOR ANGIOGENESIS." CANCER CELL **3(3)**: 219-31.
- WIDEROFF, L., G. GRIDLEY, ET AL. (1997). "CANCER INCIDENCE IN A POPULATION-BASED COHORT OF PATIENTS HOSPITALIZED WITH DIABETES MELLITUS IN DENMARK." J NATL CANCER INST **89(18)**: 1360-5.
- WILSON, G. M., J. LU, ET AL. (2003). "PHOSPHORYLATION OF P40AUF1 REGULATES BINDING TO A + U-RICH mRNA-DESTABILIZING ELEMENTS AND PROTEIN-INDUCED CHANGES IN RIBONUCLEOPROTEIN STRUCTURE." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **278(35)**: 33039-33048.
- WILUSZ, C. J., M. WORMINGTON, ET AL. (2001). "THE CAP-TO-TAIL GUIDE TO MRNA TURNOVER." NAT REV MOL CELL BIOL **2(4)**: 237-246.
- WU, L. AND J. G. BELASCO (2008). "LET ME COUNT THE WAYS: MECHANISMS OF GENE REGULATION BY MIRNAS AND SI RNAs." MOL CELL **29(1)**: 1-7.
- XU, L., L. HUI, ET AL. (2001). "EXPRESSION PROFILING SUGGESTED A REGULATORY ROLE OF LIVER-ENRICHED TRANSCRIPTION FACTORS IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA." CANCER RES **61(7)**: 3176-81.
- XU, N., C. Y. CHEN, ET AL. (1997). "MODULATION OF THE FATE OF CYTOPLASMIC MRNA BY AU-RICH ELEMENTS: KEY SEQUENCE FEATURES CONTROLLING MRNA DEADENYLATION AND DECAY." MOL CELL BIOL **17(8)**: 4611-21.
- ZHOU, L., D. PICARD, ET AL. (2010). "SILENCING OF THROMBOSPONDIN-1 IS CRITICAL FOR MYC-INDUCED METASTATIC PHENOTYPES IN MEDULLOBLASTOMA." CANCER RES **70(20)**: 8199-210.
- ZITTERMANN, S. I., M. I. CAPURRO, ET AL. (2010). "SOLUBLE GLYPICAN 3 INHIBITS THE GROWTH OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN VITRO AND IN VIVO." INT J CANCER **126(6)**: 1291-301.

Rôle de la protéine HuR et de ses gènes cibles dans le carcinome hépatocellulaire

Résumé

HuR est une protéine liant l'ARN, qui contrôle l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Dans le cytoplasme, HuR module la stabilité et la capacité de traduction des ARNm sur lesquels elle se fixe. Nos résultats montrent que HuR est surexprimée dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) humain et dans des lignées de CHC en culture. HuR est anormalement retrouvée dans le cytoplasme des cellules hépatiques tumorales, et participe à leur prolifération. En combinant l'analyse globale des gènes régulés par l'extinction d'HuR, celle des ARNm liés à HuR et celle du transcriptome des CHC humains, nous avons identifié 2 gènes dont l'expression est régulée par HuR. Ces gènes sont sous-exprimés dans les tissus de CHC et participent à la mise en place du phénotype cancéreux (résistance à l'apoptose, prolifération cellulaire, invasion,...).

Abstract

HuR is a RNA binding protein that controls gene expression at post-transcriptional level. In the cytoplasm, HuR modulates the stability and capacity of mRNA translation upon which it binds. Our results show that HuR is overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and in human HCC cell lines in culture. HuR is abnormally found in the cytoplasm of liver tumor cells, and contribute to their proliferation. By combining the global analysis of genes regulated by the extinction of HuR, the mRNAs associated with HuR and the transcriptome of human HCC, we identified two genes whose expression is regulated by HuR. These genes are under-expressed in HCC tissues and participate in the development of cancerous phenotype (resistance to apoptosis, cell proliferation, invasion ,...).

Laboratoire d'accueil :

Groupe de Recherche pour l'Etude du Foie

INSERM U889

Université Victor Segalen Bordeaux 2

33076 BORDEAUX CEDEX