



Dérégulation de HuR (ELAV-like 1) et prolifération dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules

Charlène Vigouroux

► To cite this version:

Charlène Vigouroux. Dérégulation de HuR (ELAV-like 1) et prolifération dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. hal-01732559

HAL Id: hal-01732559

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732559>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Charlène Vigouroux

le 18 Avril 2013

Dérégulation de HuR (ELAV-like 1) et prolifération dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules

Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD	Président
Monsieur le Professeur Yves MARTINET	Juges
Monsieur le Professeur Christophe PARIS	
Madame le Docteur Joëlle SIAT	
Monsieur le Docteur Guillaume GAUCHOTTE	Juge et Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY
Président de l'Université de Lorraine : Professeur Pierre MUTZENHARDT
Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE
Vice Doyen « Pédagogie » : Professeur Karine ANGIOI
Vice Doyen Mission « sillon lorrain » : Professeur Annick BARBAUD
Vice Doyen Mission « Campus » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ
Vice Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN
Vice Doyen Mission « Recherche » : Professeur Jean-Louis GUÉANT

Assesseurs :

- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bruno CHENUÉL
- « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales »	M. Christophe NÉMOS
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	Professeur Jean-Pierre
« <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> »	
BRONOWICKI	Professeur Paolo DI PATRIZIO
« <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> »	
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Commission de Prospective :	Professeur Pierre-Edouard
BOLLAERT	
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE
KORWIN	
Assesseurs Relations Internationales	Professeur Jacques HUBERT

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX
Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND
- Pierre BEY
Patrick BOISSEL - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude
BURLET -
Daniel BURNEL - Claude CHARDOT - François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY
- Jean-Pierre
DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Adrien
DUPREZ – Jean-Bernard
DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER -
Hubert GERARD
Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN -
Claude HURIET
Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES -
Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard
LEGRAS
Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ – Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE -
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre
PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert
PERCEBOIS Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU -
Jacques POUREL
Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND -
René-Jean ROYER
Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle SOMMELET

Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert
UFFHOLTZ
Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel
WEBER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON – Professeur Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeur Rosa-Maria RODRIGUEZ-
GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIEWSKI – Professeur Evelyne SCHVOERER

3^{ème} sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (*Médecine et santé au travail*)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Professeur Pierre BORDIGONI - Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY
Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ
Professeur Gérard AUDIBERT – Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeur Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT
Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
Professeur Luc TAILLANDIER – Professeur Louis MAILLARD

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT – Professeur Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD

Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL
Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (*Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie*)

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (*Néphrologie*)

Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (*Urologie*)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (*Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie*)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie générale*)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (*Pédiatrie*)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER

Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie infantile*)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (*Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale*)

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN

4^{ème} sous-section : (*Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale*)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeur Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON – Professeur Muriel BRIX

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

=====

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Médecine Générale

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteur Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteur Aude BRESSENOT

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteur Sophie FREMONT - Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Docteur Mathias POUSSEL – Docteur Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteur Véronique VENARD – Docteur Hélène JEULIN – Docteur Corentine ALAUZET

2^{ème} sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

2^{ème} sous-section (*Médecine et Santé au Travail*)

Docteur Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie : oncologie (type mixte : biologique)*)

Docteur Lina BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (*Immunologie*)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (*Génétique*)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

3^{ème} sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (*Rhumatologie*)

Docteur Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (*Dermato-vénéréologie*)

Docteur Anne-Claire BURSZTEJN

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie*)

Docteur Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire*)

Docteur Stéphane ZUILY

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (*Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie*)

Docteur Laure JOLY

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

3^{ème} sous-section :

Docteur Olivier MOREL

5^{ème} sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteur Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Mr Nick RAMALANJAONA

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA

Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} section : **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Nguyen TRAN

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteur Sophie SIEGRIST

Docteur Arnaud MASSON

Docteur Pascal BOUCHE

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

- Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE

Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL - Professeur Michel BOULANGÉ

Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ

Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Michèle KESSLER -

- Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS

Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON – Professeur Michel SCHMITT

Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER -

Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT

Professeur Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET – Professeur Michel WAYOFF

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume Uni)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)
Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (USA)
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de WUHAN (CHINE)

Remerciements

A notre Maître et Président de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Professeur d'Anatomie et Cytologie pathologiques

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail de thèse.

Pour vos conseils avisés qui nous ont permis de mener à bien ce travail,

Pour votre riche enseignement dont vous nous avez fait bénéficier pendant toutes ces années,

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre plus grand respect.

A nos Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Yves MARTINET

**Professeur de Pneumologie ; Chevalier dans l'Ordre National de la Légion
d'Honneur**

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse

*Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre
sincère reconnaissance*

Monsieur le Professeur Christophe PARIS

Professeur de Maladie et santé au travail

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse

*Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre
sincère reconnaissance*

Madame le Docteur Joëlle SIAT

Docteur en Chirurgie thoracique

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse

*Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre
sincère reconnaissance*

A notre Juge et Directeur de Thèse,

Monsieur le docteur Guillaume GAUCHOTTE

Nous sommes très honorée de vous compter parmi nos juges.

Vous avez accepté avec enthousiasme de diriger et juger cette thèse.

Votre disponibilité et votre soutien ont permis l'aboutissement de ce travail.

Nous vous remercions pour votre confiance et votre bienveillance.

Votre conscience professionnelle et votre dévouement à l'enseignement apportent beaucoup à notre discipline.

Que cette thèse soit le reflet de notre respectueuse reconnaissance.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur François PLENAT

Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (option biologie)

Pour nos séances au multi-tête et votre grande disponibilité.

Pour votre riche enseignement dès nos premières années d'internat et vos précieux conseils.

Veillez trouver ici la manifestation de notre plus grand respect et de notre gratitude.

A nos Maîtres successifs,

Monsieur le Docteur Lionnel GEOFFROIS

Monsieur le Docteur Claude SCHERER

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Monsieur le Professeur Philippe JONVEAUX

Monsieur le Professeur François PLENAT

Madame le Docteur Agnès LEROUX

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

Madame Lydia BROCHIN,

Pour ta grande disponibilité, ton investissement dans ce travail, tes conseils avisés et pour ton immense patience,

Reçois mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle Stéphanie LACOMME,

Pour tes précieux conseils.

A toutes les techniciennes du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Hôpital Central et en particulier aux techniciennes d'immunohistochimie,

Pour votre précieuse aide technique et votre disponibilité.

Monsieur Jean-Matthieu CASSE,

Pour ta bonne humeur constante et ton investissement dans ce travail.

Madame Christine RONTONDA et Madame Kossar HOSSEINI,

Pour la réalisation des études statistiques, votre réactivité et votre disponibilité

Dc Shyue-Fang Battaglia-Hsu de l'unité INSERM U954 dirigée par le Pr Guéant,

Pour votre expertise

A tous les médecins qui ont contribué à notre formation et en particulier :

Madame le Docteur Béatrice MARIE,

pour votre riche enseignement tout au long de mon internat, je suis très honorée de pouvoir continuer à apprendre à vos côtés.

Madame le Docteur Jacqueline CHAMPIGNEUILLE,

pour votre accueil sympathique lors de mes débuts, votre rigueur et le riche enseignement apporté tout au long de mon internat.

Madame le Docteur Aude MARCHAL-BRESSENOT,

pour ton émulation dans le domaine scientifique et ton riche enseignement.

Mademoiselle le Docteur Virginie CAHN,

pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton riche enseignement. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie familiale et professionnelle.

Madame le Docteur Karine MONTAGNE, Madame le Docteur Nathalie MARCON et Madame le Docteur Amandine ROUSSEAU,

pour votre accueil, votre enseignement et votre soutien dès mes premiers mois d'internat.

Mademoiselle le Docteur Claire BASTIEN,

ta passion du métier est le meilleur exemple que l'on puisse avoir. J'espère pouvoir profiter encore longtemps de ton enseignement.

Madame le Docteur Camille LEMARIE-DELAUNAY,

pour ta constante bonne humeur, nos séances au multi-tête, j'espère travailler un jour à tes côtés.

Mademoiselle le Docteur Marie Pierre WISSLER,

pour tous les bons moments partagés, j'aurai aimé pouvoir travailler plus longtemps en ta compagnie.

**Madame le Docteur Agnès LEROUX, Madame le Docteur Catherine BARLIER-PAGEL,
Mademoiselle le Docteur Colette MIGEON ainsi que Monsieur le Docteur Pascal
GENIN.**

*Soyez assurés de ma grande reconnaissance pour votre rigoureux
enseignement.*

**Aux médecins attachés et en particulier Madame le Docteur Nicole EHMANN-
KRIER.**

Merci de m'avoir fait profiter de vos connaissances.

**A toute l'équipe technique et aux secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie
Pathologiques de Central,**

Pour votre bonheur humeur et votre disponibilité.

**A toute l'équipe technique et aux secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie
Pathologiques de Brabois,**

Pour votre gentillesse et votre professionnalisme

**A toute l'équipe technique et aux secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie
Pathologiques du Centre Alexis Vautrin,**

*Pour votre accueil chaleureux et votre sympathie dont je garderai un souvenir
précieux.*

A Sandra, Nathalie, Sylviane et Roseline,

A mes co-internes, Mathieu, Radwan, Riazate :

Peut-être aurons-nous l'occasion de se croiser en RCP....

A mes futurs collègues Catherine, Jacques, Antoine, Charlie, Céline

Merci pour votre soutien

et en particulier Hélène et Jean Matthieu

pour nos fous rires passés et à venir.

A tous les membres de ma famille et en particulier :

A Benoit,

Pour ton soutien au quotidien et ta grande patience,

Pour être disponible et à l'écoute,

A Timothée,

Tu es mon rayon de soleil.

A mes parents,

*Pour leur soutien inconditionnel, pour tous les efforts fournis pour me
permettre de réussir. Sans vous tout cela n'aurait pas été possible.*

A mon petit frère Alban,

Je suis très fière de toi.

A ma mamie,

*Merci de si bien t'occuper de tes petits-enfants. Nous avons beaucoup de
chance de t'avoir à nos côtés.*

A Marie-Jo,

Tu tiens une place particulière dans mon cœur.

A Chounette,

Savoir que l'on peut compter sur toi est très réconfortant.

A mes oncles et tantes, mes cousins et cousines,

Pour tous les bons moments passés ensemble

A Brigitte, Etienne, Gaëlle, Greg et Anthony,

Merci de m'avoir acceptée au sein de votre famille

A mes amis :

Ceux des premières années de médecine, Sab, Zaz, Marie, Jerem, David et tous les autres

A Emeline et Constance, *malgré la distance notre amitié est sincère*

A Estelle, Anne Agathe de Serre de la Prada, Léa, Marie et Jean-François *merci pour tous ces apéros !*

A Claire, *sans toi je n'en serais pas là. Merci pour ta bonne humeur et ton petit grain de folie. Je suis très fière d'être ton amie.*

A Ronan et Laetitia, *pour tous les bons moments passés et à venir*

Et tous les autres,

A tous, je dédie cette thèse.

Serment

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".

INTRODUCTION	24
I. Généralités	24
I.1 Epidémiologie.....	24
I.2 Histologie.....	25
I.3 Stade TNM.....	27
I.4 Facteurs pronostiques.....	27
II. HuR (ou ELAV-like1)	28
II.1 La protéine	28
II.2. Sa fonction.....	28
II.3. Sa localisation.....	28
II.4. Ses gènes cibles	29
II.5. HuR et cancers.....	30
III. Ki-67 et MCM6	32
III.1 Ki-67.....	32
III.2 MCM6.....	33
IV. Les micro-ARNs (miARNs)	35
IV.I Rôle et mode d'action des miARNs.....	35
IV.2 MiR et HuR	37
OBJECTIFS DE L'ETUDE	38
MATERIEL ET METHODES	39
I. Population	39
II. Etude immunohistochimique de l'expression de HuR, méthyl-Hur, Ki67 et MCM6	39
II.1 Principe et protocole.....	39
II.2 Anticorps utilisés	40
II.3 Analyse	40
III. Etude en Western-Blot de HuR et méthyl-HuR.....	41

III.1 Extraction des protéines	41
III.2 Dosage des protéines	41
III.3 Western-Blot	41
III.4 Anticorps utilisés	42
IV. Analyse des micro-ARNs par RT-qPCR.....	42
IV.1 Extraction des ARN.....	42
IV.2 L'étape de RT (reverse transcription)	43
IV.3 La PCR en temps réel	43
IV.4 La sonde TaqMan	43
IV.5 Quantification relative par la technique du $\Delta\Delta Ct$	44
V. Analyse statistique	45
RESULTATS	47
I. Données cliniques et histologiques.....	47
II. Facteurs pronostiques connus	47
III. Etude immunohistochimique de HuR, méthyl-HuR, Ki67 et MCM6.....	49
III.1 Hur	49
III.2 Méthyl-HuR	50
III.3 MCM6	54
III.4 KI67	54
III.5 Corrélation entre les facteurs	58
III. Etude de HuR et méthyl-HuR en Western Blot	59
IV. Etude des micro-ARNs miR 16 et miR 519 en RT-qPCR	60
IV.1 Etude comparative du taux de miR 16 et miR 519 entre tumeur et tissu sain	60
IV.2 Corrélation avec l'expression de HuR	62
DISCUSSION	63

I. Expression de HuR et de méthyl-HuR au sein du des cellules tumorales de CBNPC et au sein de l'épithélium bronchique, impact sur la survie et corrélation avec les autres facteurs pronostiques.	63
II. Etude des micro-ARNs miR 16 et miR 519	64
III. Etude des marqueurs de prolifération Ki67 et MCM6	65
CONCLUSION	66
BIBLIOGRAPHIE.....	67
ANNEXE 1	72
ANNEXE 2	73
ANNEXE 3	74
ANNEXE 4	75
ANNEXE 5	76
ANNEXE 6	77

INTRODUCTION

I. Généralités

I.1 Epidémiologie

Le cancer bronchique est la première cause de mortalité par cancer dans le monde (1). En France il représente le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme, et le troisième chez la femme. Il s'agit de la première cause de décès par cancer chez l'homme et de la troisième chez la femme (annexe 1).

Comme dans le reste du monde la prévalence et la mortalité diminuent chez l'homme alors qu'elles augmentent chez la femme (2), (3).

Figure IV-1 Évolution par périodes de cinq ans de la mortalité des cancers ayant les taux les plus élevés chez l'homme entre les périodes 1983-87 et 2003-07. Projections pour l'année 2010

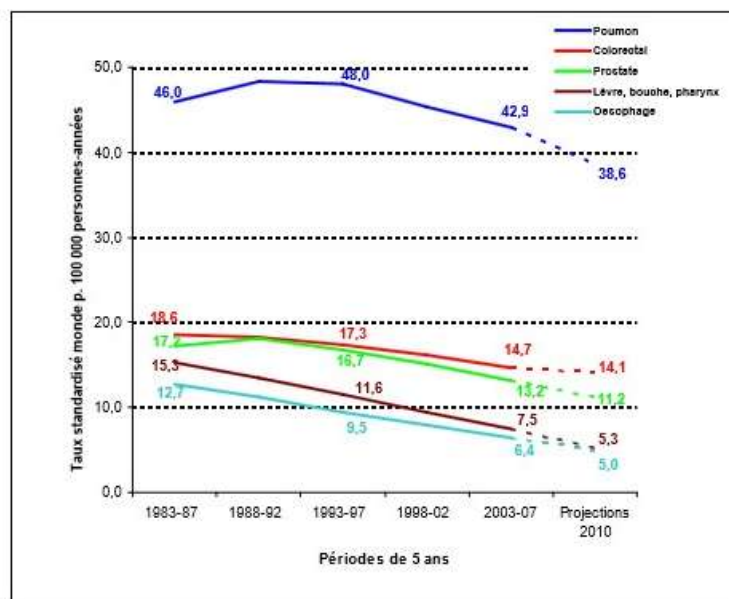


Figure 1: mortalité par cancer chez l'homme (3)

Figure IV-2 Évolution par périodes de cinq ans de la mortalité des cancers ayant les taux les plus élevés chez la femme entre les périodes 1983-87 et 2003-07. Projections pour l'année 2010

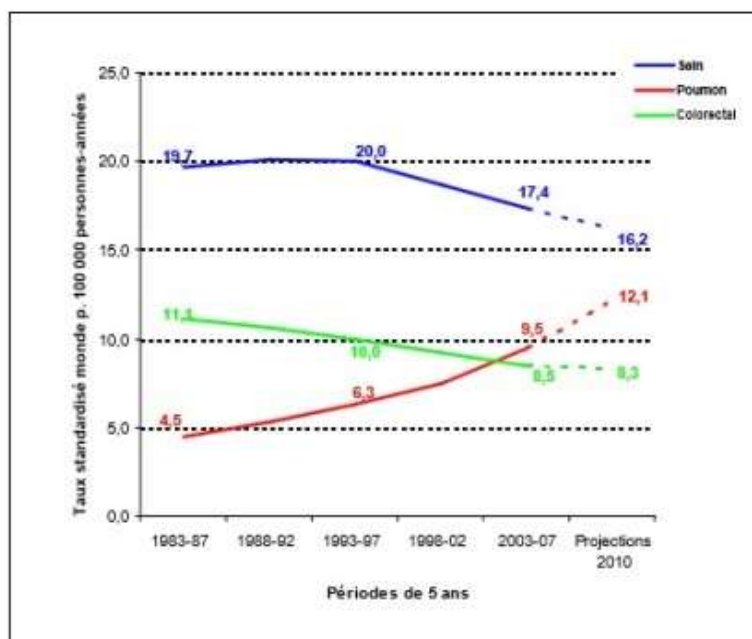


Figure 2: mortalité par cancer chez la femme (3)

I.2 Histologie

Les carcinomes bronchiques se divisent en deux grands groupes : les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC) et les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC).

Parmi les CBNPC, on distingue les carcinomes épidermoïdes et les adénocarcinomes. Historiquement, les carcinomes épidermoïdes étaient les plus fréquents mais ils ont été supplantés par les adénocarcinomes, en raison semble-t-il de la modification des habitudes tabagiques (1).

En 2011 une nouvelle classification histologique des adénocarcinomes a été proposée par l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) afin d'harmoniser la terminologie et de supprimer le vaste groupe des adénocarcinomes de sous type mixte de la classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) 2004 (4).

Le terme bronchioloalvéolaire est supprimé pour être remplacé par le terme lépidique. L'ancien carcinome bronchioloalvéolaire (BAC) devient adénocarcinome in situ, et

l'entité anciennement dénommée BAC à invasion minime devient adénocarcinome à invasion minime. Dans leur définition ces deux lésions mesurent moins de 3 cm.

Enfin les adénocarcinomes infiltrants sont désormais classés selon leur architecture prédominante en 5 catégories : à prédominance lépидique, acineux, papillaire, micropapillaire et solide.

On reconnaît également dans cette classification différentes variantes d'adénocarcinomes infiltrants : mucineux, colloïde, foetal, et entérique.

TABLE 1. IASLC/ATS/ERS Classification of Lung Adenocarcinoma in Resection Specimens
Preinvasive lesions
Atypical adenomatous hyperplasia
Adenocarcinoma in situ (≤ 3 cm formerly BAC)
Nonmucinous
Mucinous
Mixed mucinous/nonmucinous
Minimally invasive adenocarcinoma (≤ 3 cm lepidic predominant tumor with ≤ 5 mm invasion)
Nonmucinous
Mucinous
Mixed mucinous/nonmucinous
Invasive adenocarcinoma
Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with >5 mm invasion)
Acinar predominant
Papillary predominant
Micropapillary predominant
Solid predominant with mucin production
Variants of invasive adenocarcinoma
Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
Colloid
Fetal (low and high grade)
Enteric
BAC, bronchioloalveolar carcinoma; IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society.

Figure 3: classification IASLC des adénocarcinomes

I.3 Stade TNM

La classification actuellement utilisée est celle proposée par l’AJCC (American Joint Committee on Cancer) en 2009 et reprise dans la 7^{ème} édition TNM de l’UICC (Union for International Cancer Control). Cette édition a profondément modifié la classification TNM des cancers bronchiques afin de mieux corréliser chaque sous-groupe T, N et M à la survie globale (5) (annexe 2 et 3).

I.4 Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques les plus classiquement admis dans le carcinome bronchique sont l’âge, le sexe, le performance-status et le stade TNM.

La nouvelle classification IASLC introduit un nouveau facteur pronostique, notamment pour les adénocarcinomes de stade I : le sous-type histologique des adénocarcinomes. La plupart des études s’accordent pour définir 3 groupes pronostiques en fonction notamment du risque de survenue des métastases et de la survie (6)(7)(8)(9).

Le groupe « bas grade » regroupe les adénocarcinomes in situ et les adénocarcinomes à invasion minime. Ces deux entités ont une survie globale et une survie sans récurrence à 5 ans proches de 100% (7)(10).

L’adénocarcinome à prédominance lésionnelle, avec une survie à 5 ans proche de 90%, est soit classé dans le groupe « bas grade » soit dans le groupe « grade intermédiaire ».

Le groupe « grade intermédiaire » regroupe les adénocarcinomes d’architecture acineuse et papillaire avec une survie à 5 ans aux alentours de 70 % (7).

Enfin, le groupe « haut grade » regroupe les adénocarcinomes d’architecture solide et micropapillaire.

II. HuR (ou ELAV-like1)

II.1 La protéine

HuR est une protéine de 36kDa, dont le gène est situé sur le chromosome 19 (11), qui appartient à la famille des protéines ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision) décrite par analogie avec le gène Elav de la mouche drosophile. Cette famille protéique comporte également les protéines HuB, HuC, HuD. Chez l'homme ces dernières protéines sont présentes dans les noyaux des neurones matures et sont impliquées dans l'encéphalomyélite paranéoplasique et la neuropathie sensorielle paranéoplasique. HuR est quant à elle exprimée de façon ubiquitaire (12).

II.2. Sa fonction

HuR est une protéine de liaison à l'ARN (acide ribonucléique) Ces protéines sont dénommées RBP (RNA Binding Protein). Les RBP sont impliquées dans la maturation et la stabilisation des ARNm (ARN messagers). Elles ont en commun de posséder des domaines de liaison à l'ARN appelés RRM (RNA Recognition Motif). Ces domaines se lient aux ARNs simple brin. Ils contiennent environ 90 acides aminés et sont souvent présents plusieurs fois au sein d'une même protéine. Plus d'une trentaine de motifs différents ont été décrits (13)(14). HuR possède trois RRM, qui reconnaissent spécifiquement des séquences d'ARN riche en adénosine et en uracile (AREs) situées dans la région 3' de nombreux ARNm (15)(16).

II.3. Sa localisation

HuR est de localisation essentiellement nucléaire. Cependant sa capacité à stabiliser et/ou à moduler la traduction de nombreux ARNm est étroitement liée à sa translocation dans le cytoplasme (17). Ce transport à travers la membrane nucléaire est sous la dépendance du domaine HNS (HuR Nuclear Shuttling) (18). L'activation de ce domaine dépend d'une grande variété de stimuli aussi bien endogènes qu'exogènes (19), qui aboutissent à des modifications post traductionnelles de HuR, telles que la phosphorylation, l'acétylation ou la méthylation (19)(20).

La méthylation de HuR est sous la dépendance de CARM-1 (Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1), une arginine méthyl-transférase, qui agit principalement sur

l'arginine en position 217 (20). Cette arginine est située au niveau du domaine HNS entre les domaines RRM1 et RRM2.

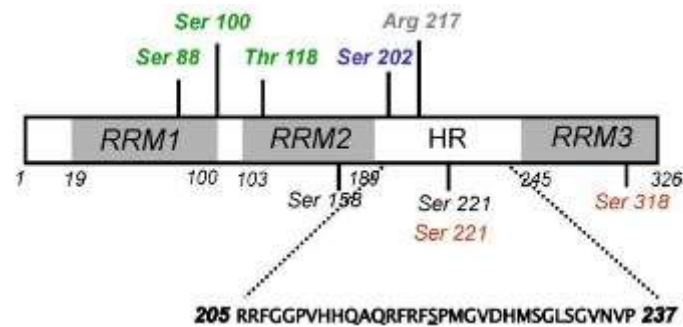


Figure 4: les différents domaines de HuR (19)

Les conséquences de la méthylation de HuR et les éventuelles modifications de fonction qu'elle pourrait entraîner sont à ce jour mal connues, même si le fait que l'arginine méthylée se situe dans le domaine HNS suggère une modification dans le passage de HuR à travers la membrane nucléaire. Ainsi la méthylation de HuR pourrait favoriser son passage dans le cytoplasme et /ou inhiber sa réintroduction dans le noyau (19).

II.4. Ses gènes cibles

Parmi les ARNm possédant des séquences ARE, qui sont les cibles potentielles de HuR, nombreux sont ceux impliqués dans la cancérogénèse (21).

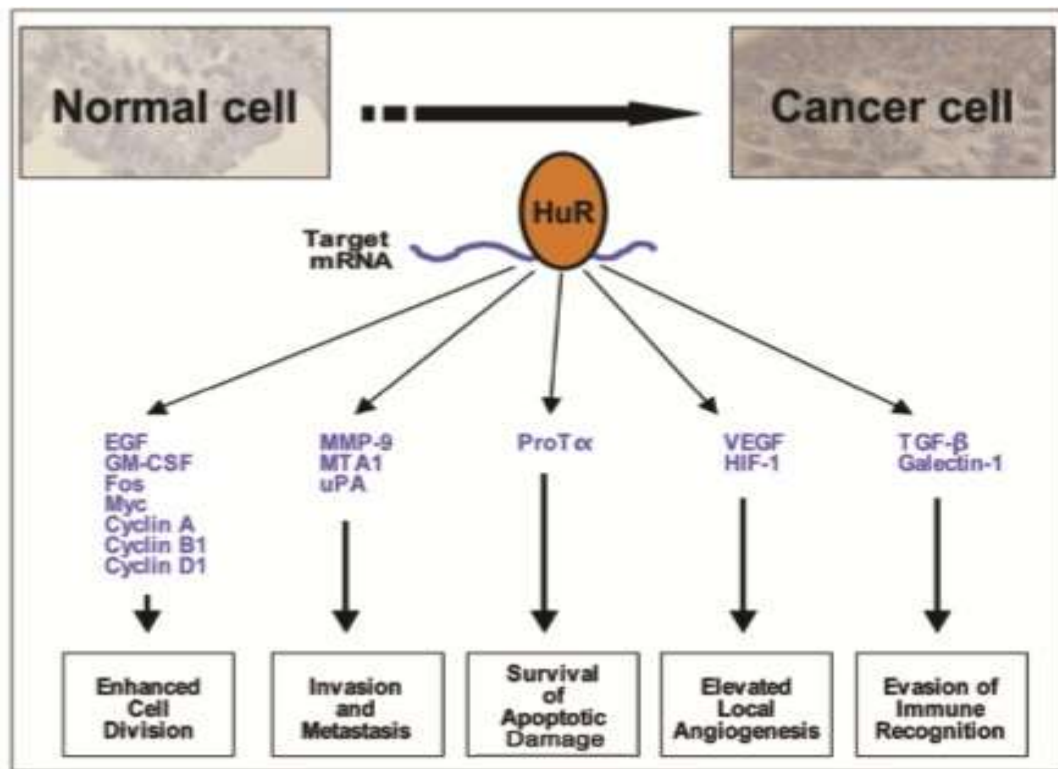


Figure 5: les gènes cibles de HuR (21)

En effet, il a été démontré que HuR avantage l'expression de gènes codant pour des protéines qui augmentent la prolifération (EGF, Fos, Myc, cyclines, etc.), inhibent l'apoptose (ProTalpha), favorisent l'angiogenèse (VEGF, HIF1alpha), réduisent la réponse immunitaire (TGFBeta, galectine 1) et facilitent l'invasion cellulaire (MMP9, uPA).

II.5. HuR et cancers

Dans une étude portant sur 182 tumeurs d'origine gastrique, pulmonaire, colique, thyroïdienne et rénale, l'expression de la protéine HuR a été analysée par marquage immunohistochimique (22). Il ressort de cette étude que le niveau d'expression de la 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 les tissus non tumoraux. A l'inverse, dans les tissus tumoraux le taux de protéine HuR est fortement augmenté avec une présence accrue dans le cytoplasme (22).

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 (23)(24), les carcinomes ovariens (25), les mésothéliomes (26), le cancer de la prostate (27), les carcinomes épidermoïdes laryngés (28). Une étude réalisée sur les carcinomes ovariens a également montré que l'augmentation du niveau d'HuR nucléaire était associée à des tumeurs de haut grade et à un mauvais pronostic (29).

D'après nos connaissances, une seule étude a analysé l'expression de méthyl-HuR dans les tissus tumoraux humains. Vasquez-Chantada et al. ont étudié le rôle de HuR et méthyl-Hur durant la dédifférenciation hépatique aboutissant à des carcinomes hépatocellulaires. Il apparaît dans cette étude que le taux de méthyl-Hur est fortement diminué dans les tissus tumoraux (30).

En 2003, Blaxall et al. ont mis évidence une surexpression cytoplasmique de HuR dans des tumeurs pulmonaires induites chez la souris ainsi que dans des lignées cellulaires à croissance rapide (31).

Par la suite dans une série portant sur 81 CBNPC, Wang et al. ont démontré une association entre la surexpression cytoplasmique de Hur et un risque plus élevé d'extension métastatique ganglionnaire (32)(33). La même équipe a réalisé en 2011 une étude portant sur 132 patients opérés de CBNPC, parmi lesquels 74 carcinomes épidermoïdes et 50 adénocarcinomes, de stades I, II et III. L'expression de HuR a fait l'objet d'une évaluation semi-quantitative, à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules tumorales, pour aboutir à la classification des tumeurs en deux groupes: marquage négatif/faible vs marquage modéré/intense. Cette étude a mis en évidence, en analyse univariée, une corrélation entre l'expression cytoplasmique de HuR et, à la fois la survie globale et la survie sans récurrence. En analyse multivariée, l'expression cytoplasmique de HuR ressort comme un facteur pronostique aux côtés du stade (33).

Plus récemment Lauriola et al. sont parvenus à des conclusions similaires en étudiant 54 adénocarcinomes de stade I et II. Il ressort de cette étude que l'expression cytoplasmique de HuR est non seulement corrélée à la survie mais également au risque métastatique. Enfin, c'est ici un faible rapport entre l'expression nucléaire et l'expression cytoplasmique de HuR qui apparaît comme un facteur de mauvais pronostic (34).

En revanche, Kim et al. sur une série de 244 patients dont 151 carcinomes épidermoïdes et 93 adénocarcinomes, en utilisant également une évaluation semi-quantitative du niveau d'expression de HuR, ne sont pas parvenus à mettre en évidence de lien statistiquement significatif entre Hur et la survie (35).

III. Ki-67 et MCM6

III.1 Ki-67

Ki-67 est une protéine non histone exprimée lors de la fin de la phase G1, et des phases S, G2 et M du cycle cellulaire et dont la quantité augmente tout au long de ce cycle (36)(37).

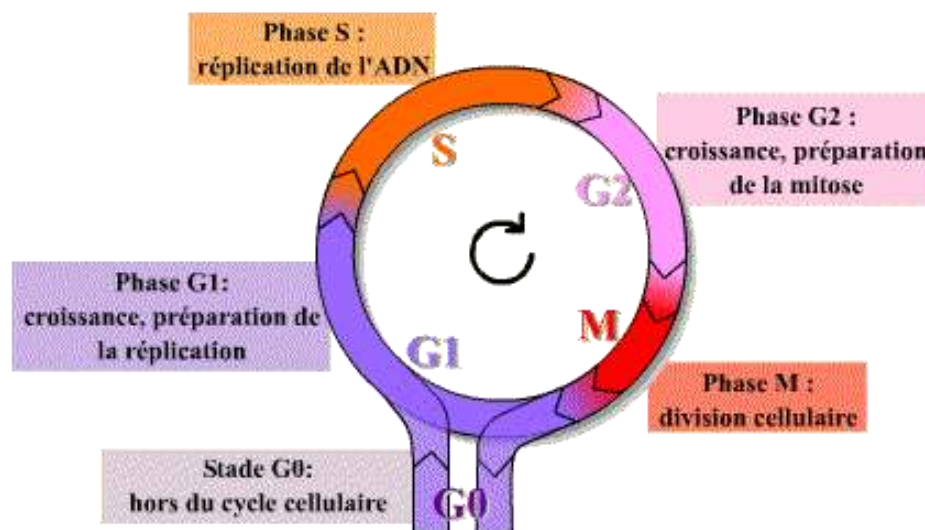
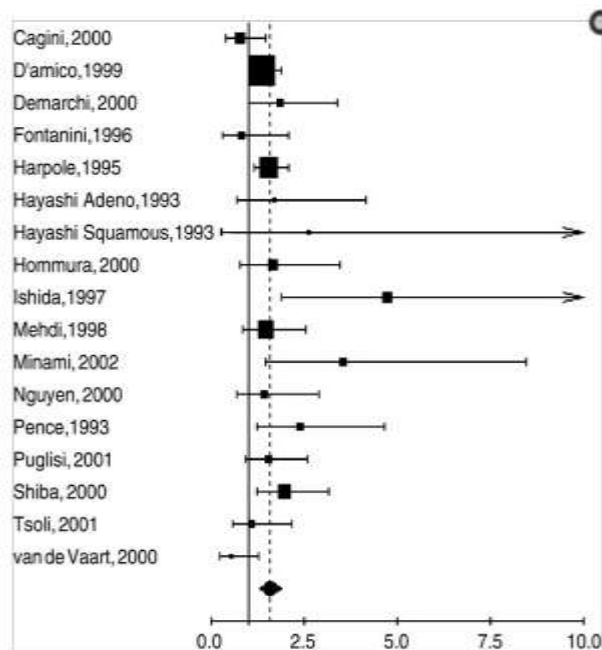


Figure 6: schéma du cycle cellulaire d'après <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/>

Son expression uniquement par les cellules en cycle (hors G0) en fait un marqueur reconnu d'estimation de la prolifération des tumeurs (38), et est corrélée dans certaines études à l'évolution clinique.

Ainsi, le niveau de marquage par Ki67 intervient dans le grade des tumeurs endocrines digestives selon l'OMS 2010 (39) et devient un argument décisionnel important dans les prises en charge des adénocarcinomes mammaires, notamment de grade SBR II (Scarff Bloom and Richardson) (40).

Dans les carcinomes bronchiques, de nombreuses études ont tenté de démontrer le rôle pronostique du nombre de cellules tumorales marquées par l'anticorps anti-Ki67. Les résultats sont divergents (41) : sur les 29 études intéressant des CBNPC, 10 ne montraient pas de lien statistique entre le nombre de cellules tumorales marquées par Ki-67 et un mauvais pronostic. En revanche la méta-analyse réalisée à partir des 16 études éligibles retrouvait une association significative entre Ki67 et mauvais pronostic.



Results of the meta-analysis with all NSCLC studies. A hazard ratio (HR)>1 implies a worse survival for the group with no increased Ki-67 expression. The square size is proportional to the number of patients included in each study. The centre of the lozenge gives the combined HR for the meta-analysis and its extremities the 95% confidence interval.

Figure 7: résultat de la méta-analyse sur les 16 études éligibles (41)

III.2 MCM6

MCM 6 (MiniChromosome Maintenance Protein 6) est une protéine indispensable à la réplication cellulaire. Elle appartient au complexe MCM qui comprend 6 protéines (MCM2 à MCM7) et qui fait lui-même partie du complexe pré-réplcatif. Ce complexe MCM a une activité hélicase et intervient au début de la phase S du cycle cellulaire, lors des étapes d'initiation et d'élongation. Comme Ki-67, MCM6 est exprimée dans les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire, mais avec une expression plus précoce au cours de G1 que la protéine

Ki-67, permettant ainsi d'obtenir un marquage d'une proportion plus importante de cellules en cycle.

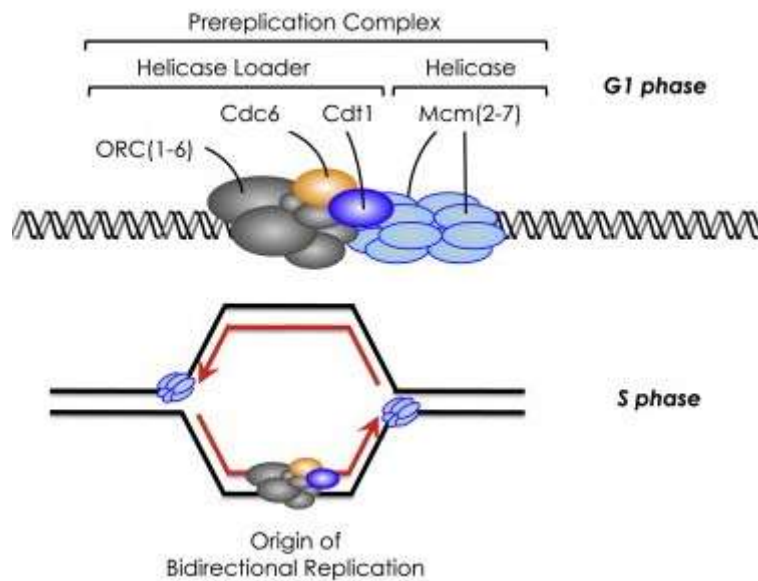


Figure 8 : complexe pré-réplicatif (42).

De par leur implication dans la prolifération cellulaire, les protéines du complexe MCM ont fait l'objet de nombreuses études cherchant à déterminer un éventuel rôle pronostique dans l'évolution des tumeurs (43)(44)(45)(46). Nous avons par exemple démontré dans les méningiomes une forte corrélation entre l'expression de MCM6 et le grade histologique ainsi que la survie sans récurrence (47). Dans les CBNPC, seule la protéine MCM 7 a été identifiée comme un marqueur de mauvais pronostic, chez des patients atteints d'adénocarcinomes classés pT1 (46). Dans cette étude un grand nombre de cellules marquées par MCM7 a un impact sur la survie globale, sans corrélation au stade TNM. Il n'y a pas à notre connaissance d'étude portant sur MCM6 dans les cancers du poumon.

IV. Les micro-ARNs (miARNs)

IV.I Rôle et mode d'action des miARNs

Les micro-ARNs sont de courts ARN simple brin, d'environ 22 nucléotides, qui ont un rôle de régulateur post-transcriptionnel. Ils interagissent avec certains ARNm cibles via la reconnaissance d'une séquence complémentaire.

La plupart des micro-ARNs régulent négativement l'expression de leurs gènes soit par la dégradation de l'ARNm soit en inhibant leur traduction en protéines.

Avant d'être actifs sous leur forme mature les micro-ARNs subissent de multiples étapes. Les molécules précurseurs qui sont codées par les gènes des miARNs sont beaucoup plus longues que le miARN mature. Deux ribonucléases, Drosha et Dicer, traitent le transcrit primaire (ou pri-miARN) pour générer un miARN mature. Les transcrits primaires comportent environ 70 nucléotides et contiennent une ou plusieurs structures « tige-boucle ». Ces structures sont constituées par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième moitié de sa séquence. La ribonucléase Drosha excise la structure « tige-boucle » pour former le précurseur, un pré-miARN. Après l'exportation dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par la ribonucléase Dicer pour générer un ARN double brin. Après détorsion, un des brins d'ARN devient le miARN mature simple brin alors que l'autre brin est dégradé.

La séquence complémentaire des miARNs est généralement située sur l'extrémité 3'UTR des ARNs cibles. Afin d'effectuer son activité régulatrice, le miARN doit être intégré au complexe RISC (RNA-induced silencing complex).

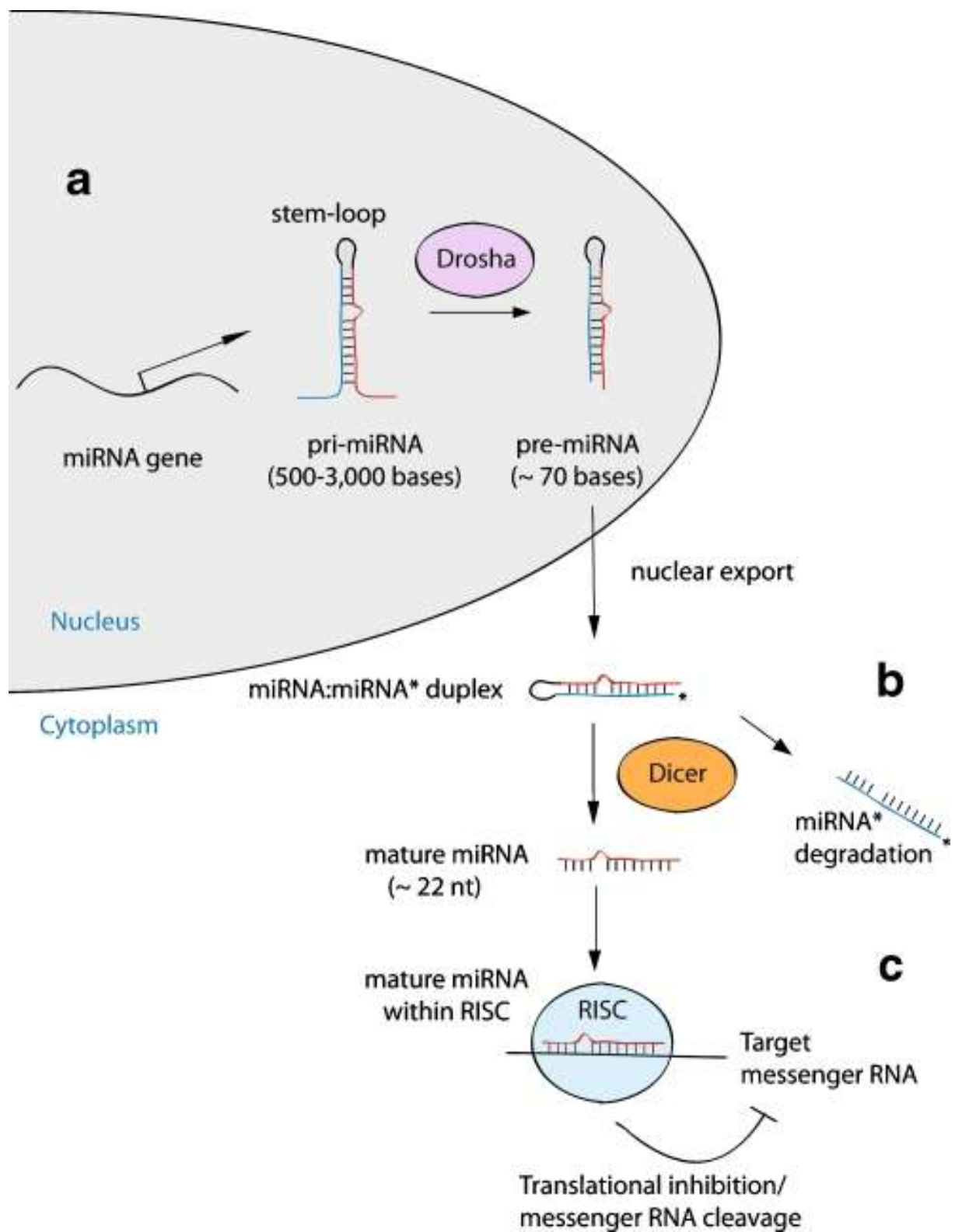


Figure 9: genèse des micro-ARNs(48)

Certains de ces micro-ARNs ayant une activité oncogénique sont dénommés « oncomiRs » (49). D'autres en revanche auraient un rôle suppresseur de tumeur.

D'une manière générale une baisse globale du niveau des miARNs a été observée dans les tissus tumoraux humains par rapport aux tissus non tumoraux correspondants (50).

Dans les carcinomes bronchiques de multiples études ont permis l'identification de plusieurs micro-ARNs dont le niveau d'expression est soit augmenté soit diminué (51).

IV.2 MiR et HuR

HuR est un gène cible potentiel de deux micro-ARNs, entre autres, miR 16 et miR 519. Les données de la littérature suggèrent que miR 16 régulerait négativement l'expression de HuR dans les carcinomes mammaires (52). MiR 519 diminue la prolifération tumorale et la croissance tumorale en réduisant le niveau d'expression de la protéine HuR, sans modification du taux d'ARNm de HuR(53)(54). De plus un niveau d'expression de miR 16 dérégulé dans le tissu tumoral par comparaison au tissu sain a été démontré comme étant un facteur de mauvais pronostic dans les CBNPC (55).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de l'étude est de rechercher une surexpression de HuR dans les cellules tumorales de CBNPC et de déterminer s'il s'agit d'un facteur pronostique.

Les objectifs secondaires sont :

- étudier la distribution et le niveau d'expression de méthyl-HuR
- déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression de HuR et les marqueurs de prolifération Ki-67 et MCM6.
- déterminer le niveau d'expression des micro-ARNs miR16 et miR519 dans les tissus tumoraux, et déterminer s'il existe une corrélation avec l'expression de HuR.

MATERIEL ET METHODES

I. Population

190 patients opérés entre 2005 et 2007 d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes bronchiques au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy ont été inclus de façon consécutive. Les données cliniques et pathologiques ont été extraites des données recueillies par le Centre de Ressource Biologique (CRB) au sein de la cohorte « Cancers bronchiques et mésothéliomes pleuraux » et complétées si besoin. Parmi ces patients on dénombre 122 adénocarcinomes et 68 carcinomes épidermoïdes. Les patients ont tous subi une résection chirurgicale carcinologique associée à un curage hilair et médiastinal. Aucun des patients n'avait reçu de chimiothérapie néoadjuvante. L'âge moyen lors de la chirurgie est de 62 ans. Le sous type histologique des adénocarcinomes a été déterminé selon la classification IASLC proposée en 2010. Le stade TNM a été défini d'après 7ème édition de la classification TNM.

II. Etude immunohistochimique de l'expression de HuR, méthyl-Hur, Ki67 et MCM6

II.1 Principe et protocole

Le but des techniques immunohistochimiques est la mise en évidence de protéines par une reconnaissance antigène-anticorps. On utilise pour cela un anticorps primaire puis un système de révélation reposant sur le système Flex + Envision (Dako), sur l'automate DakoAutostainer Plus (Dako).

L'antigène au niveau du tissu est détecté par un anticorps primaire de lapin, de souris ou de chèvre. Pour amplifier le signal celui-ci se lie à un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris (LINKER). Dans le cas d'un anticorps de chèvre une étape supplémentaire avec un anticorps secondaire anti-chèvre produit chez le lapin (Dako) est nécessaire. Ce dernier se fixe à un polymère composé d'un dextrane lié à des anticorps de chèvre se fixant aux immunoglobulines de lapin ou de souris et à de multiples molécules de peroxydase (Envision FLEX/HRP). Le montage est ensuite révélé par un système chromogène-substrat

avec l'ajout de peroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine (DAB). Le protocole complet est disponible en annexe 4.

II.2 Anticorps utilisés

Les anticorps suivants ont été utilisés lors de l'analyse immunohistochimique :

Tableau 1: dilution des anticorps primaires utilisés en immunohistochimie

protéine	clone	fournisseur	dilution
HUR	Monoclonal, souris, 19F12	Santa Cruz Biotechnology	1/400
METHYL HUR	Polyclonal, lapin	Anticorps « maison »	1/2000
Ki-67	Monoclonal, souris, MIB 1	Dako	1/200
MCM6	Polyclonal, chèvre, N-19	Santa Cruz Biotechnology	1/800

II.3 Analyse

Ki-67 et MCM6

Le nombre de cellules tumorales marquées par Ki-67 et MCM6 a été établi sur 500 cellules par 2 observateurs, de façon indépendante, dans la même zone de la lame correspondant à la zone de plus fort marquage.

HuR

Pour HuR, l'intensité de marquage a été évaluée de façon semi-quantitative, avec un score de 0 à 300. L'ensemble de la lame a été étudié.

Un score nucléaire et un score cytoplasmique ont été établis de façon différenciée dans le parenchyme sain adjacent et dans la tumeur. L'intensité de marquage a été alors définie comme suit : 0 =pas de marquage, 1=marquage faible, 2 =marquage modéré, et 3=marquage fort. Ce score a ensuite été multiplié par le pourcentage de cellules correspondant.

Le score du parenchyme sain a été évalué au sein de l'épithélium bronchique.

MéthylHuR

L'évaluation de l'expression de méthyl-HuR a été basée sur le même principe, en définissant exclusivement un score cytoplasmique (marquage nucléaire dans tous les cas absent ou très faible).

III. Etude en Western-Blot de HuR et méthyl-HuR

III.1 Extraction des protéines

Les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été extraites à partir de matériel congelé à -80°C, en utilisant une combinaison de tampon de lyse et de broyage mécanique. Les tampons de lyse ont une concentration en sels différentes selon que l'on souhaite extraire les protéines du cytoplasme ou du noyau. L'ensemble des étapes doit être réalisé sur la glace. Pour chaque cas, nous avons extrait des protéines de tissu tumoral et de parenchyme sain adjacent, après contrôle extemporané de la bonne qualité des prélèvements. Le protocole d'extraction est détaillé en annexe 5.

III.2 Dosage des protéines

Le dosage a été réalisé par technique fluorométrique (Qubit® Fluorometer, Life Technologies TM) selon les recommandations du fournisseur.

III.3 Western-Blot

Les protéines sont déposées puis séparées en fonction de leur poids moléculaire sur un gel SDS-Page à 10%, puis transférées sur une membrane PVDF. Après blocage, la membrane est incubée successivement avec l'anticorps primaire puis avec l'anticorps secondaire radiomarké. La membrane est ensuite révélée par chimiluminescence. Le protocole est disponible en annexe 6.

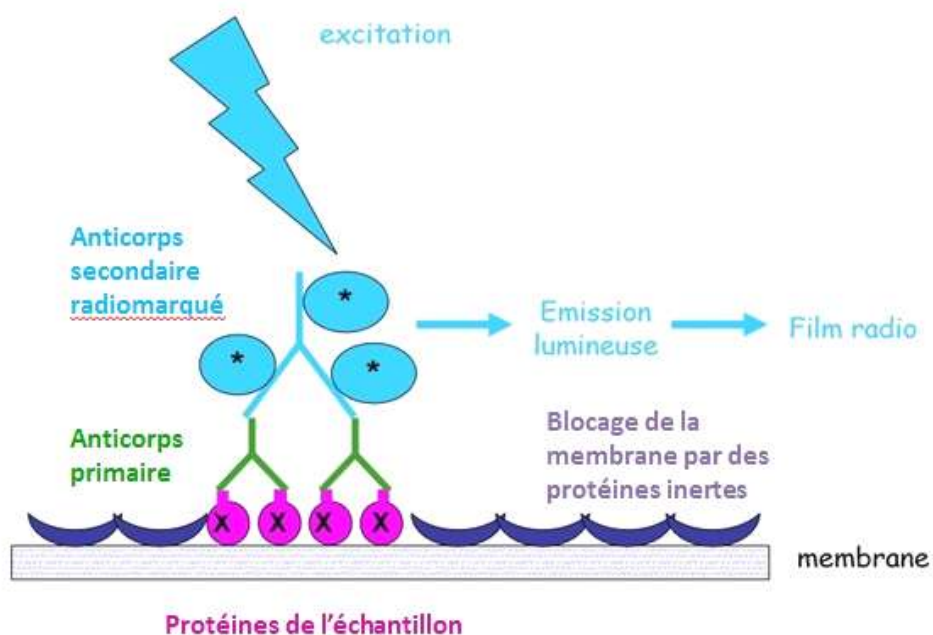


Figure 10 : principe du Western-Blot: après migration les protéines sont déposées sur une membrane PVDF. Après blocage de la membrane par des protéines inertes on dépose l'anticorps primaire. Après incubation et lavage, dépôt de l'anticorps secondaire radiomarké puis révélation par technique chimiluminescente.

III.4 Anticorps utilisés

HuR : anticorps monoclonal de souris, clone 19F12, SantaCruz Biotechnology, dilution : 1/2000, dilution anticorps secondaire : 1/5000.

Méthyl-HuR : anticorps polyclonal de lapin, dilution : 1/1000, dilution anticorps secondaire : 1/10000.

IV. Analyse des micro-ARNs par RT-qPCR

IV.1 Extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide de la solution TRIzol LS Reagent (Invitrogen). Le dosage a été réalisé par technique fluorométrique (Qubit® Fluorometer, Life Technologies™) selon les recommandations du fournisseur.

IV.2 L'étape de RT (reverse transcription)

L'étape de rétroconversion des ARNm en ADNc (ADN complémentaire) a été réalisée pour chaque miR à l'aide d'amorces spécifiques et selon les recommandations du fournisseur (TaqMan® MicroRNA Assays (AppliedBiosystem)).

IV.3 La PCR en temps réel

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

IV.4 La sonde TaqMan

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), par exemple FAM, et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, par exemple TAMRA, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce.

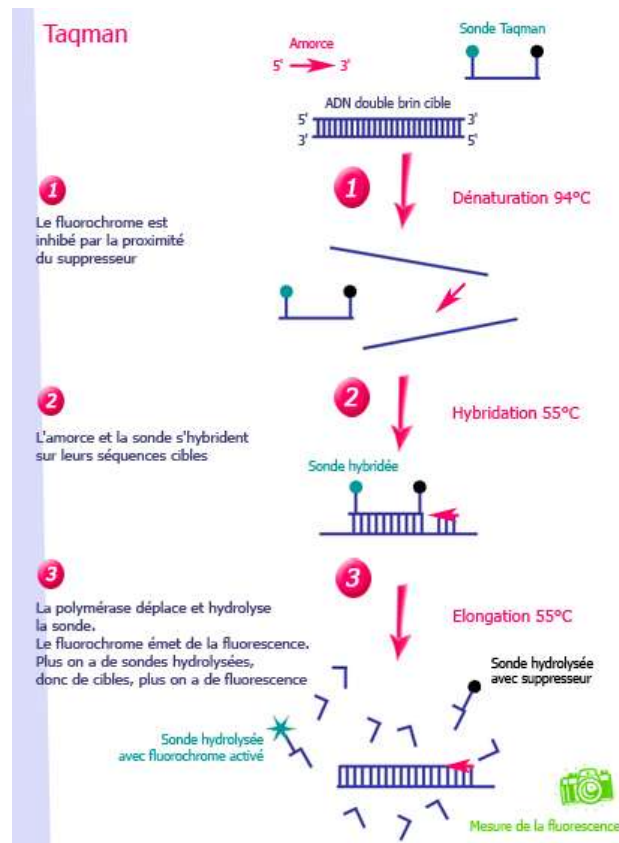


Figure 11: principe de la sonde TaqMan d'après ilm.pf

L'ensemble des techniques a été réalisé à l'aide du kit TaqMan® MicroRNA Assays (AppliedBiosystem) selon les recommandations du fournisseur.

IV.5 Quantification relative par la technique du $\Delta\Delta C_t$

La concentration du gène cible de la qPCR est dérivée de son C_T (Cycle Treshold), qui correspond au nombre de cycles d'amplification où la courbe d'amplification croise la ligne de seuil. Cette ligne de seuil est placée au milieu de la phase exponentielle. Pour un micro-ARN donné la ligne de seuil doit être au même niveau pour tous les échantillons.

Les micro-ARNs d'intérêt (miR 16 et miR 519) ont fait l'objet d'une quantification relative, c'est-à-dire que leur quantité est exprimée par rapport à un gène référence (ou gène dit « de ménage »). Nous avons choisi comme gènes de référence mir 191 et RNU6B suite aux données de la littérature (56). Le ratio d'expression gène d'intérêt/gène de ménage est ensuite normalisé par rapport à un calibrateur. Le calibrateur est un mélange de plusieurs échantillons dont le ratio d'expression gène d'intérêt/gène de ménage sera égal à

1. Les ratios des différents échantillons seront alors exprimés par rapport au ratio du calibrateur.

Nous avons de plus pris en compte l'efficacité de la PCR pour chaque micro-ARN, correspondant à l'efficacité de la réaction de PCR, pour laquelle la quantité d'ADN doit en condition optimale doubler à chaque cycle. Cette efficacité (notée E) est déterminée à partir d'une gamme de dilution. L'efficacité est optimale si égale à 1.

La formule de calcul est donc la suivante :

$$R = \frac{(1+E_{\text{gène référence}})^{\Delta CT_{\text{gène référence}}(\text{calibrateur} - \text{échantillon})}}{(1+E_{\text{gène référence}})^{\Delta CT_{\text{gène référence}}(\text{calibrateur} - \text{échantillon})}}$$

V. Analyse statistique

Les variables qualitatives ont été décrites par leurs fréquences et leurs pourcentages associés. Les variables quantitatives ont été décrites par la médiane, le minimum, et le maximum, ou la moyenne et l'écart-type. L'ensemble des données cliniques et sociodémographiques des patients a été comparé selon le score HuR. La comparaison a été faite par le test du Chi2 ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives et par le test de Kruskal-Wallis ou le test de Student pour les variables quantitatives.

La survie globale a été estimée à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier et présentée en nombre de mois et intervalle de confiance à 95%. Des analyses bivariées ont été réalisées à l'aide du test du Logrank pour étudier la corrélation entre différents facteurs et la survie. Des analyses multivariées, fondées sur le modèle à risque proportionnel de Cox, ont été réalisées afin de déterminer les variables indépendantes associées à la survie et ainsi le rôle de HuR. L'effet des différentes covariables a été estimé à l'aide du hazard ratio et de son intervalle de confiance à 95%. Les variables prises en compte dans l'analyse multivariée sont celles associées à une p-value inférieure à 20% en analyse univariée.

Nous avons déterminé avec un coefficient de corrélation de Spearman la relation:

- entre l'expression de HuR et l'expression des micro-ARNs miR16 et miR519,
- entre la localisation cytoplasmique de HuR et l'expression de méthyl-HuR
- entre l'expression de HuR et l'expression de marqueurs impliqués dans le cycle cellulaire (MCM6, Ki-67 : taux cellules marquées).

Les analyses ont été réalisées au seuil de risque alpha global fixé à 0,05 et à l'aide du logiciel SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'aide de Mesdames Kossar HOSSEINI et Christine ROTONDA du Service d'Epidémiologie et Evaluation Cliniques du CHU de Nancy.

RESULTATS

I. Données cliniques et histologiques

L'ensemble des données cliniques et histologiques sont résumées dans le tableau 2.

II. Facteurs pronostiques connus

Les variables classiques telles que le stade TNM, le statut ganglionnaire ou la taille tumorale sont significativement associées à la survie globale dans notre étude.

Tableau 2: analyse bivariée de la survie globale selon le modèle de régression de Cox (* : $p < 0.05$)

Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%		P (Pr > Khi-2)
Age	1.011	0.991	1.031	0.2836
Sexe				
hommes	1			
femmes	0.728	0.440	1.205	0.2171
Histologie				
adénocarcinomes	1			
carcinomes épidermoïdes	1.441	0.956	2.173	0.0812
T	1.182	1.025	1.363	0.0212*
N	1.711	1.340	2.186	<0.0001*
Stade	1.310	1.166	1.472	<0.0001*

Tableau 3: données cliniques et histologiques

Données		Nombre	%/moyenne
Age (années)		190	62
Sexe			
	Hommes	146	76,8%
	Femmes	44	23,2%
Survie (mois)			39,1
Récidive			
	oui	50	26,3%
	non	140	73,7%
T			
	T1a/T1b	35/43	18,4%/22,6%
	T2a/T2b	57/20	30%/10,5%
	T3	30	15,8%
	T4	5	2,6%
N			
	N0	140	73,5%
	N1	24	12,7%
	N2	26	13,8%
M			
	M0	186	97,9%
	M1	4	2,1%
Stade			
	IA/IB	70/33	36,8%/17,4%
	IIA/IIB	23/24	12,1%/12,6%
	IIIA/IIIB	35/1	18,4%/0,5%
	IV	4	2,1%
Histologie			
	adénocarcinome	122	64,2%
	carcinome épidermoïde	68	35,8%
Sous type histologique			
	lépidoïque prédominant	5	4,1%
	acineux	53	43,4%
	papillaire	21	17,2%
	solide	31	25,4%
	micropapillaire	5	4,1%
	mucineux	7	5,7%
Maladie professionnelle			
	oui	45	23,7%
	non	145	67,3%
Chimiothérapie			
	Oui/adjuvante/pour récurrence	79/69/23	41,6%
	non	111	58,4%
Radiothérapie			
	Oui/adjuvante/pour récurrence	40/ 33/8	21,1%
	non	150	78,9%
Type de résection chirurgicale			
	LSG	45	23,7%
	LIG	24	12,6%
	PG	12	6,3%
	LSD	52	27,4%
	LID	35	18,4%
	PD	14	7,4%
	LMD	8	4,2%

III. Etude immunohistochimique de HuR, méthyl-HuR, Ki67 et MCM6

III.1 Hur

Dans le tissu sain adjacent, l'expression de HuR est essentiellement nucléaire, au sein des pneumocytes et au sein des cellules bronchiques. Cependant on observe fréquemment un marquage cytoplasmique au sein des cellules bronchiques.

La moyenne du score d'expression cytoplasmique dans le parenchyme sain est de 61 contre 110 dans la tumeur. Cette différence est significative ($p < 0,0001$). Le niveau d'expression de HuR est donc significativement plus élevé dans le cytoplasme des cellules tumorales de CBNPC que dans le cytoplasme des cellules du parenchyme sain adjacent. Il en est de même pour le score d'expression global, obtenu en additionnant les scores nucléaire et cytoplasmique ($p < 0,0001$). En revanche il n'y a pas de différence significative concernant le niveau d'expression nucléaire de HuR entre tumeur et parenchyme sain ($p = 0,9307$).

Les scores d'expression de HuR, nucléaire ou cytoplasmique, ne sont pas significativement corrélés au stade (respectivement $p = 0,13$ et $p = 0,57$), à la taille tumorale (respectivement $p = 0,56$ et $p = 0,40$) ou à la présence de métastase ganglionnaire (respectivement $p = 0,06$ et $p = 0,15$) (tableau 4).

En analyse bi-variée, le score nucléaire de HuR établi au sein de la tumeur n'a pas d'impact significatif sur la survie ($p = 0,11$), de même que le score cytoplasmique ($p = 0,7353$) (tableau 5).

L'analyse multivariée a été réalisée selon 2 modèles. Dans le premier modèle, les différents scores de HuR ainsi que l'âge, le sexe, le type histologique, le stade TNM, le statut T, le statut N et les valeurs de Ki67 et MCM6 ont été intégrés. Dans le deuxième modèle, les valeurs de Ki67 et MCM6 n'ont pas été intégrées. Dans ce deuxième modèle, le score nucléaire de HuR est un facteur pronostic défavorable ($p = 0,0315$) (tableau 6), contrairement au score cytoplasmique de HuR ($p = 0,9148$).

L'analyse de survie dans le sous-groupe des adénocarcinomes réalisée selon le modèle 1 retrouve également une association significative entre le score nucléaire de HuR et la survie globale ($p < 0,05$). Ce n'est pas le cas dans le sous-groupe des carcinomes épidermoïdes.

III.2 Méthyl-HuR

L'expression de méthyl-HuR est strictement cytoplasmique. Méthyl-HuR n'est pas statistiquement plus exprimée dans les cellules tumorales que dans les cellules bronchiques ($p=0,1999$).

Le score d'expression de méthyl-HuR est inversement corrélé au sous type histologique des adénocarcinomes ainsi qu'à la taille de la tumeur : on observe une diminution du score d'expression de méthyl-HuR dans les tumeurs de plus de 3cm ($p=0,0005$) et dans les sous-types d'adénocarcinomes dits de mauvais pronostic ($p=0,0012$)(tableau 4).

En analyse bivariée, le score de méthyl-HuR a un impact protecteur sur la survie ($p=0,0360$)(tableau 5). En revanche l'association n'est pas significative en analyse multivariée ($p= 0,5676$ ou $0,1169$ selon les modèles) (tableau 6).

Tableau 4: analyse bivariée de l'association entre HuR /méthyl-HuR et les variables clinico-pathologiques (***p<0,05)

		Score cytoplasmique HuR dans la tumeur (sur 300) Régression bivariée		Score nucléaire HuR dans la tumeur (sur 300) Régression bivariée		Score méthyl-HuR dans la tumeur (sur 300) Régression bivariée	
		Moy/r*	p**	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**
CONSTANTE							
AGE		0,19	0,0095*	-0,18	0,0144 [#]	-0,07	0,3115
SEXE			0,0518		0,153		0,6745
	HOMME	118,1		250,2		101,8	
	FEMME	90,9		233,8		109,2	
Type histologique			0,8782		0,0365*		0,3581
	ADENOCARCINOME	111,1		238,8		110,8	
	CARCINOME	113		259,9		90,5	
	EPIDERMOIDE						
Sous type histologique des adénocarcinomes			0,1235		0,5919		0,0211***
	LEPIDIQUE	64		260		102	
	ACINEUX	112,9		247,9		123,8	
	PAPILLAIRE	98,1		230,5		163,3	
	SOLIDE	138,2		235,6		61,6	
	MICROPAPILLAIRE	98		226		78	
	MUCINEUX	60		203,6		102,9	
HISTOLOGIE			0,1002		0,4858		0,0012***
	BON	105,8		244		132,9	
	PRONOSTIQUE1						
	MAUVAIS	132,6		234,3		63,9	
	PRONOSTIQUE2						
T			0,4056		0,5628		0,0003***
	T1A	124,9		249,9		98,7	
	T1B	119,8		250,5		157,8	
	T2A	114,8		246,4		92,9	
	T2B	81,5		251,5		57,5	
	T3	105,2		242,2		70,5	
	T4	80		191		174	
TAILLE			0,1812		0,6853		0,0005***
	≤3cm	122,1		250,2		131,3	
	>3cm	105,9		246,2		80	
N			0,1535		0,0684		0,5658
	N0	107,4		243,7		106,9	
	N1	141,9		277,7		111,4	
	N2	107,5		231,3		78,3	
STADE			0,5702		0,1365		0,3033
	IA	120,1		247,3		125,3	
	IB	105,8		239,2		104,2	
	IIA	116,1		274,1		93,9	
	IIB	87,9		242,5		74,6	
	IIIA	119,4		239,3		93,3	
	IIIB	20		100		80	
	IV	92,5		250		42,5	
STADE BIS			0,6186		0,3185		0,085
	I	115,5		244,7		118,5	
	II	101,7		258		84	
	III et IV	114,3		236,9		87,9	

* Moyenne par modalité pour variables qualitatives, coefficient de corrélation pour variables quantitatives

**Test d'analyse de variance à un facteur si égalité des variances, test de Kruskal-Wallis sinon pour variables qualitatives, test de corrélation pour variables quantitatives

Seuls les facteurs présentant une association significative au seuil none en régression bivariée ont été candidates. n= 104. R²= 0.25.

1 sous types histologiques lépidique prédominant, acineux et papillaire

2 sous types histologiques solide et micropapillaire

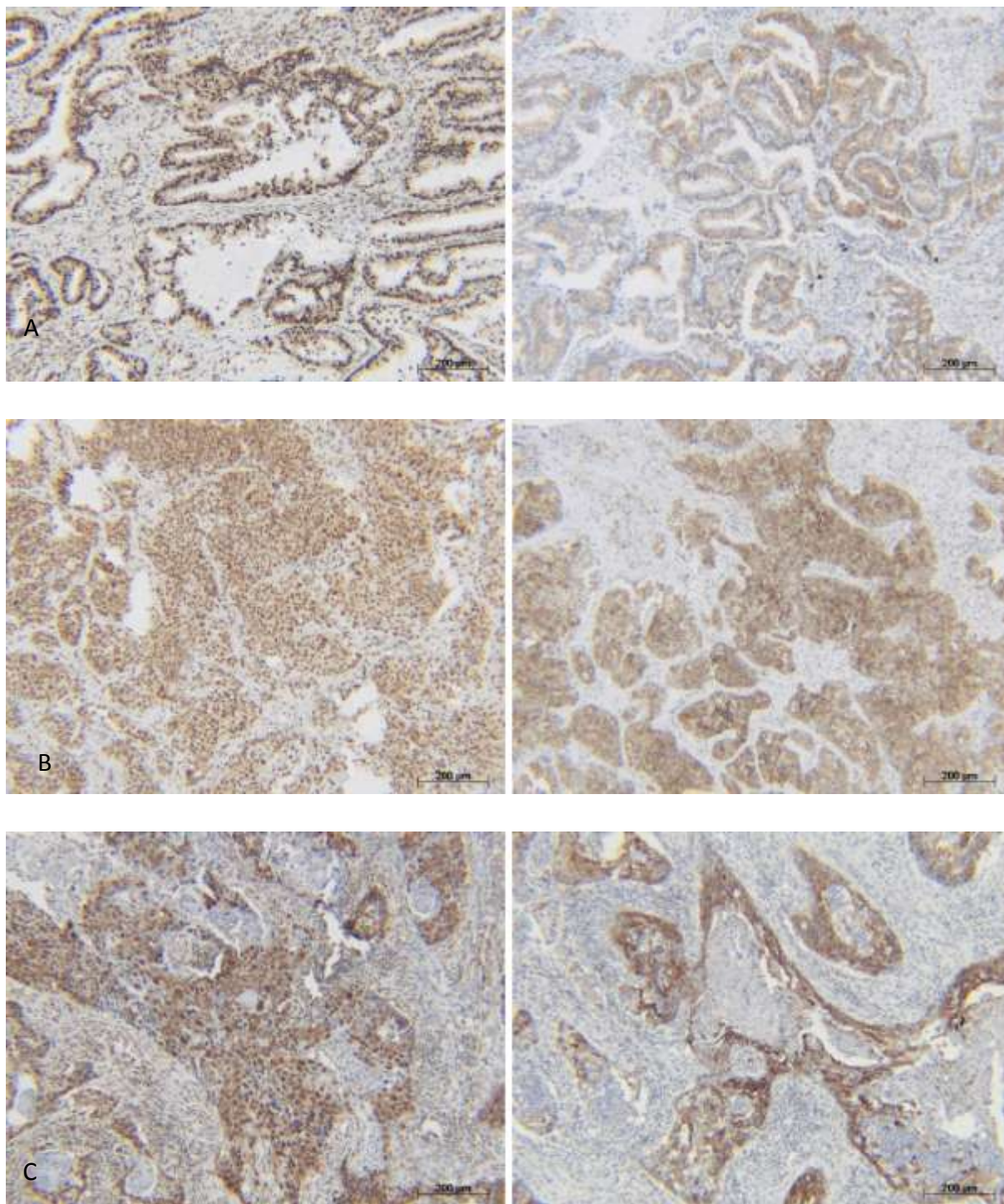


Figure 12 : exemples de marquage nucléaire et cytoplasmique de HuR associé à un marquage cytoplasmique intense de méthyl-HuR. A : adénocarcinome acineux, B : adénocarcinome solide, C : carcinome épidermoïde ; à gauche : HuR, à droite : méthyl-HuR

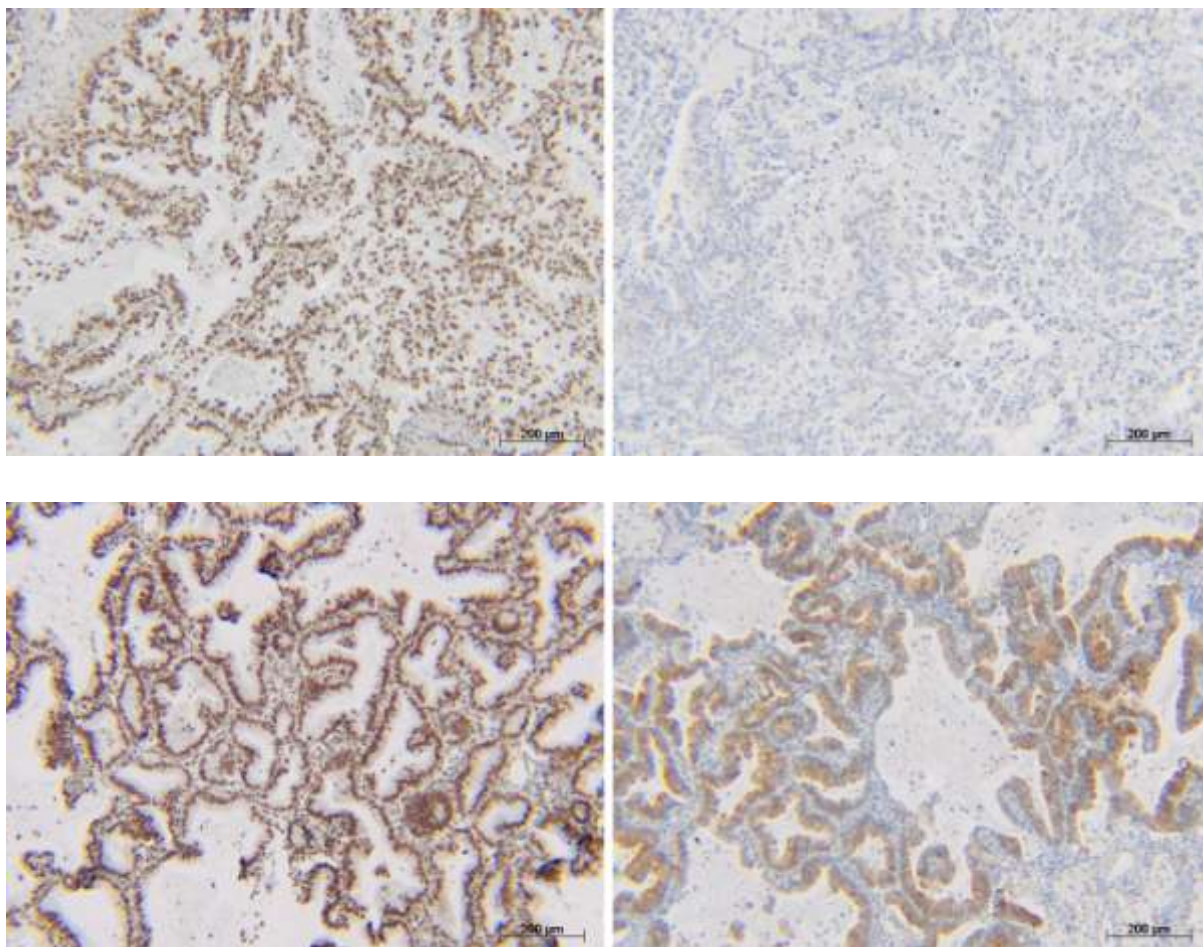


Figure 13 : Exemple de deux adénocarcinomes papillaires. A gauche : HuR, à droite : méthyl-HuR. A : marquage strictement nucléaire de HuR et absence de marquage par méthyl-HuR. B : marquage strictement nucléaire de HuR et marquage cytoplasmique par méthyl-HuR.

III.3 MCM6

La moyenne des cellules marquées par l'anticorps anti-MCM6 est de 77% dans le sous-groupe des adénocarcinomes et de 92 % dans le sous-groupe des carcinomes épidermoïdes (différence significative $p < 0,0001$).

Le coefficient de corrélation intra-classe entre les deux lecteurs est de 0,92 (IC à 95% : 0.8684-0.9439) ce qui signifie un excellent degré d'accord entre les lecteurs.

En analyse bivariée, le nombre de cellules marquées par l'anticorps anti-MCM6 a un impact négatif significatif sur la survie ($p < 0,01$) (tableau 5). Il n'y a pas de corrélation en analyse multivariée ($p = 0,71$) (tableau 6).

III.4 Ki67

La moyenne des cellules marquées par l'anticorps anti-Ki67 est de 37% dans le sous-groupe des adénocarcinomes et de 59,6 % dans le sous-groupe des carcinomes épidermoïdes (différence significative $p < 0,0001$).

Le coefficient de corrélation intra-classe entre les deux lecteurs est de 0,94 (IC à 95% 0.8824-0.9618) ce qui signifie un excellent degré d'accord entre les lecteurs.

En analyse bivariée, le nombre de cellules marquées par l'anticorps anti-Ki67 a un impact négatif significatif sur la survie ($p < 0,01$) (tableau 5). Cette corrélation est également retrouvée en analyse multivariée ($p < 0,01$) (tableau 6).

Tableau 5 : analyse bivariée de la survie globale selon le modèle de régression de Cox (* : p<0.05)

Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%		P (Pr > Khi-2)
HuR nucléaire	1.003	0.999	1.006	0.1144
HuR cytoplasmique	1.000	0.998	1.003	0.7353
Méthyl-HuR	0.998	0.996	1	0.0360*
MCM6	1.004	1.001	1.007	0.0096*
Ki67	1.003	1.001	1.005	0.0015*

Tableau 6 analyse multivariée de la survie globale selon la régression de Cox (*p<0,05).

Modèle 1 :				
HUR nucléaire HUR cytoplasmique méthyl-HuR TSméthyl-HuR				
MCM6moy MIB1moy âge sexe histo T N Stade				
Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%		Pr > Khi-2
HURnucléaire	1.003	0.999	1.008	0.1060
HURcytoplasmique	0.999	0.996	1.002	0.6072
méthyl-HuR	0.999	0.997	1.002	0.5676
Ki67moy	1.004	1.001	1.006	0.0015*
Age	1.030	1.007	1.053	0.0104*
Stade	1.325	1.154	1.522	<0.0001*

TS : tissu sain

Modèle 2 :				
HURnucléaire HURcytoplasmique méthyl-HuR TSméthyl-HuR				
âge sexe histo T N Stade				
Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%		Pr > Khi-2
HUR nucléaire	1.004	1.000	1.008	0.0315*
HUR cytoplasmique	1.000	0.997	1.003	0.9148
méthyl-HuR	0.998	0.996	1.000	0.1169
Stade	1.306	1.143	1.492	<0.0001*

TS : tissu sain

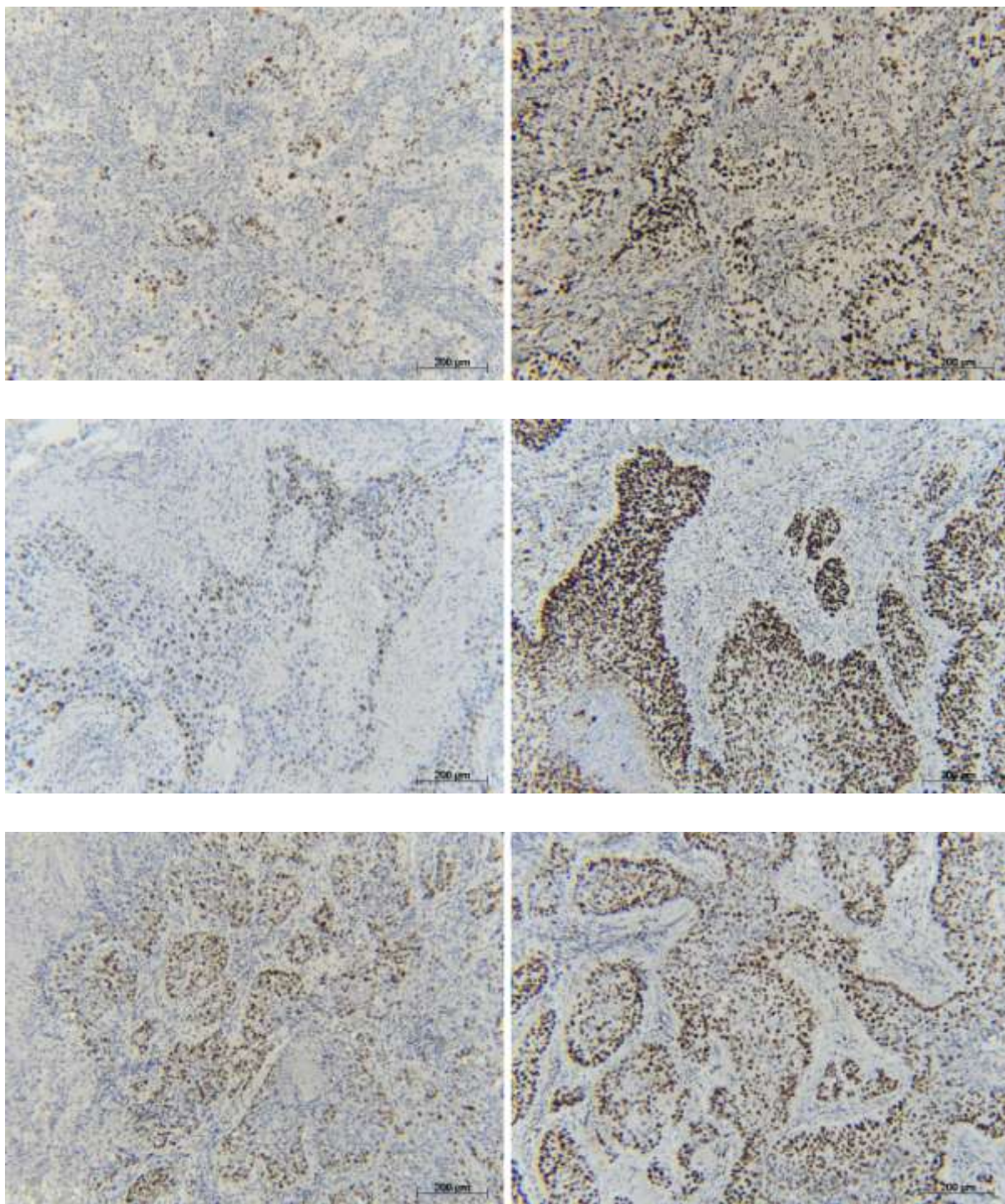


Figure 14 : à gauche, marquage par anticorps anti-Ki67 ; à droite marquage par anticorps anti-MCM6. A : adénocarcinome solide, B et C : carcinomes épidermoïdes.

III.5 Corrélation entre les facteurs

Les variables MCM6 et Ki67 varient dans le même sens et sont fortement corrélées entre elles ($\rho=0,6598$, $p<0,0001$). Ces deux variables sont également corrélées aux scores nucléaire de HuR ($\rho=0,32435$, $p<0,0001$ pour MCM6 et $\rho=0,23936$, $p=0,00011$ pour Ki-67) et plus faiblement au score cytoplasmique de HuR. Enfin elles varient en sens inverse du score de méthyl-HuR ($\rho=-0,23883$, $p=0,0009$ pour MCM6 et $\rho=-0,20068$ et $p=0,0062$ pour Ki67)(tableau 7).

Le score de HuR nucléaire est corrélé au score de HuR cytoplasmique et plus faiblement au score de méthyl-HuR. Les scores de Hur cytoplasmique et de méthyl-HuR sont bien corrélés entre eux ($\rho= 0,31886$, $p<0,0001$) (tableau 7).

Tableau 7: tableau de corrélation des différents scores (* $p<0,05$)

Coefficients de corrélation de Pearson Proba > r sous H0: $\rho=0$						
		HuR nucléaire	HuR cytoplasmique	Méthyl- HuR	MCM6 moy	Ki-67 moy
HuRnucléaire	Rho	1.00000	0.41326	0.15099	0.32435	0.23936
	p		<i><.0001</i>	<i>0.0381</i>	<i><.0001</i>	<i>0.0011</i>
HuR cytoplasmique	Rho	0.41326	1.00000	0.31886	0.18103	0.14993
	p	<i><.0001</i>		<i><.0001</i>	<i>0.0127</i>	<i>0.0422</i>
méthylHuR	Rho	0.15099	0.31886	1.00000	-0.23883	-0.20068
	p	<i>0.0381</i>	<i><.0001</i>		<i>0.0009</i>	<i>0.0062</i>
MCM6moy	Rho	0.32435	0.18103	-0.23883	1.00000	0.65898
	p	<i><.0001</i>		<i>0.0009</i>		<i><.0001</i>
Ki-67moy	Rho	0.23936	0.14993	-0.20068	0.65898	1.00000
	p	<i>0.0011</i>	<i>0.0422</i>	<i>0.0062</i>	<i><.0001</i>	

III. Etude de HuR et méthyl-HuR en Western Blot

En Western Blot, on retrouve pour HuR une bande à 37 kDa, correspondant au poids moléculaire décrit dans la littérature. Pour méthyl-HuR, on retrouve une bande à 37 kDa, mais également à 50 kDa. L'étude en Western-Blot des protéines HuR et méthyl-HuR réalisée sur 7 cas retrouve une surexpression de HuR et de méthyl-HuR dans les tumeurs ainsi que la localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique de HuR et plus préférentiellement cytoplasmique de méthyl-HuR.

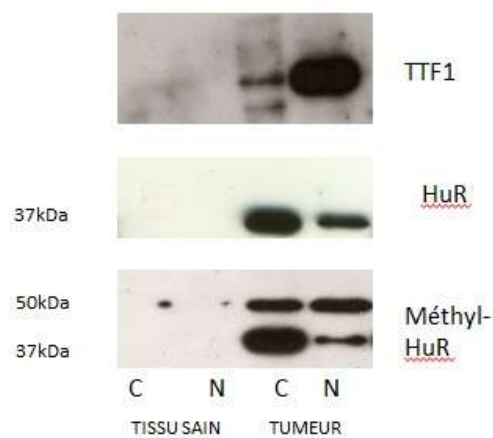


Figure 15 : exemple d'expression de HuR et de méthyl-HuR

IV. Etude des micro-ARNs miR 16 et miR 519 en RT-qPCR

IV.1 Etude comparative du taux de miR 16 et miR 519 entre tumeur et tissu sain

L'efficacité de la qPCR était pour miR 16 de 1,96, et pour miR 519 de 2,04.

Parmi les couples « tissu sain/tumeur » testés, le ratio normalisé de miR 519 était inférieur dans la tumeur par rapport tissu sain dans 18 échantillons sur 20 (90%), mettant ainsi en évidence une différence significative entre tumeur et tissu sain apparié (test de Wilcoxon apparié, $p < 0,001$).

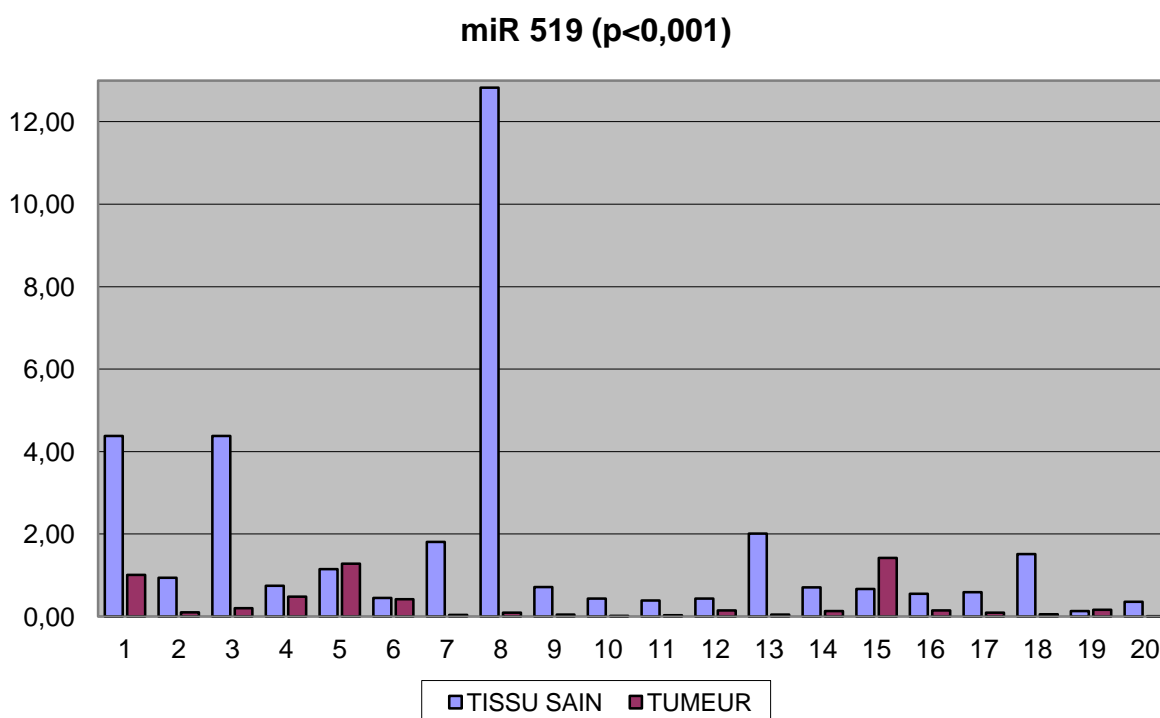


Figure 16 : ratio normalisé de miR 519

Parmi les couples « tissu sain/tumeur » testés, le ratio normalisé de miR 519 était inférieur dans la tumeur par rapport tissu sain dans 16 échantillons sur 20 (80%). L'expression de miR 519 était ainsi significativement diminuée dans les tumeurs (test de Wilcoxon apparié, $p < 0,001$).

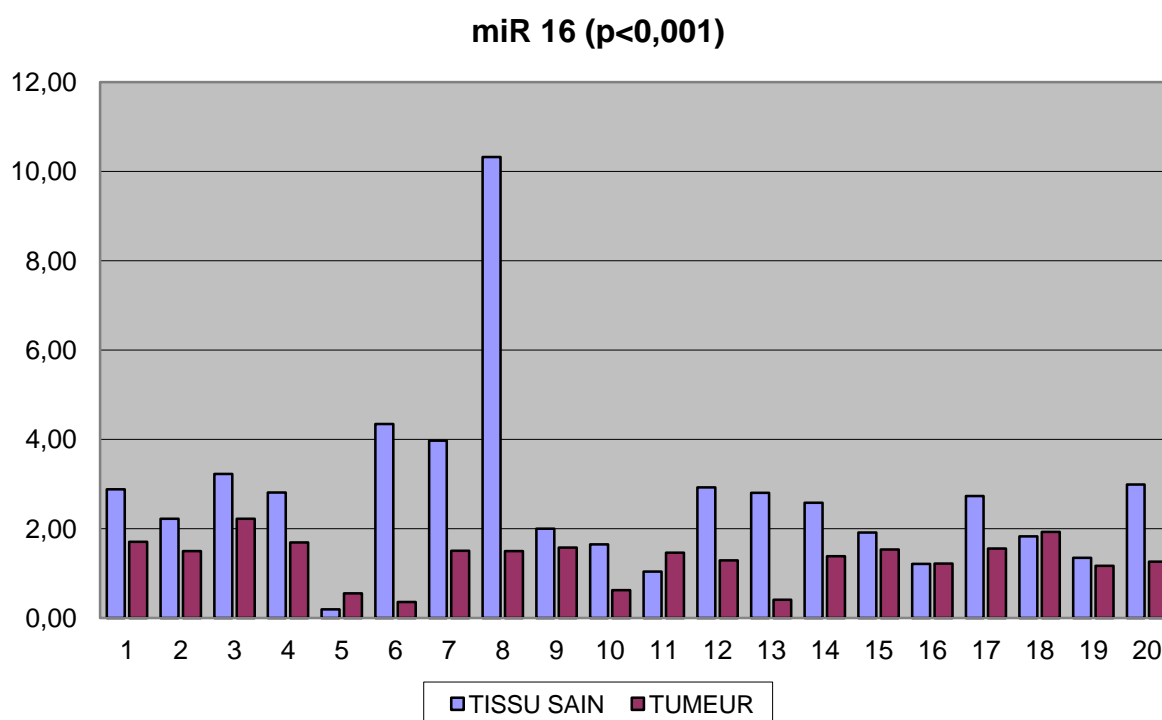


Figure 17 : ratio normalisé de miR 16

IV.2 Corrélation avec l'expression de HuR

Dans notre étude il n'a pas été retrouvé de corrélation significative entre la baisse d'expression des micro-ARNs miR 519 et miR16 dans les tissus tumoraux, et l'expression de méthyl-HuR ou de HuR, qu'il s'agisse du score nucléaire(HuRN), cytoplasmique(HuRC) ou global (tableau 8).

Tableau 8: corrélation entre HuR/méthyl-HuR et les micro-ARNs

Coefficients de corrélation de Spearman				
Proba > r sous H0: Rho=0				
	HURN	HURC	METHYLHUR	HuRglobal
MIR519	-0.3312	-0.1153	-0.0255	-0.1798
	P=0,15	p=0,63	p=0,92	p=0,45
MIR16	-0.0753	-0.2833	-0.1285	-0.1576
	P=0,75	p=0,23	p=0,59	p=0,51

DISCUSSION

I. Expression de HuR et de méthyl-HuR au sein des cellules tumorales de CBNPC et au sein de l'épithélium bronchique, impact sur la survie et corrélation avec les autres facteurs pronostiques.

Le niveau d'expression de HuR est globalement augmenté dans les cellules tumorales de CBNPC par rapport aux cellules de l'épithélium bronchique adjacent. Nos résultats confirment que la protéine HuR est exprimée de façon plus intense dans le cytoplasme des cellules tumorales que dans le cytoplasme des cellules bronchiques, ce qui est concordant avec les données de la littérature. Cette exportation de HuR vers le cytoplasme est sous la dépendance du domaine HNS, qui subit de multiples modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, la méthylation de l'arginine 217 aboutit à la protéine reconnue par l'anticorps anti méthyl-HuR que nous avons utilisé. La méthylation de HuR est sous la dépendance de CARM-1, une protéine de localisation essentiellement nucléaire. La méthylation de HuR a donc lieu dans le noyau. Notre étude démontre que la localisation de méthyl-HuR est strictement cytoplasmique appuyant l'hypothèse que la méthylation de HuR empêcherait son retour dans le noyau (19). Néanmoins l'absence de surexpression significative de méthyl-HuR dans les cellules tumorales suggère que la forme méthylée ne représente pas la majorité de la protéine HuR cytoplasmique.

Dans notre étude, le score de méthyl-HuR est corrélé négativement avec la taille de la tumeur et les formes histologiques d'adénocarcinome de bon pronostic. La baisse d'expression de méthyl-HuR dans les tumeurs de plus de 3 cm et dans les formes histologiques agressives suggère que méthyl-HuR a une action opposée à HuR. En effet, la surexpression cytoplasmique de HuR au sein de divers tissus tumoraux est classiquement associée à des tumeurs de grande taille, et peu différenciées. Ce résultat est à mettre en parallèle avec les résultats d'une étude réalisée sur des tissus tumoraux et des lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire (CHC) (30). Cette étude démontrait une expression accrue de méthyl-HuR dans les foies normaux par rapport aux foies porteurs de CHC. Notre étude démontre également que méthyl-HuR est un facteur pronostic favorable vis-à-vis de la survie globale. Il s'agit à notre connaissance de la première étude montrant un probable rôle protecteur de méthyl-HuR.

Contrairement à ce qui était attendu, nous n'avons pas mis en évidence d'association significative entre le score cytoplasmique de HuR et la survie globale, mais au contraire entre le score nucléaire de HuR et la survie globale. Une précédente étude comportant des carcinomes ovariens et utilisant la même méthode de quantification aboutissait au même résultat (29), démontrant que le score nucléaire de HuR était un facteur pronostique défavorable indépendant en analyse multivariée. Ces résultats incitent à penser que la localisation de HuR ne suffit pas à prédire sa fonction.

Enfin, le rôle de HuR dans le métabolisme de la deoxycytidine kinase, principale enzyme du métabolisme de la gemcitabine (57), pourrait faire de HuR un éventuel marqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie.

II. Etude des micro-ARNs miR 16 et miR 519

Plus de 184 micro-ARNs ont été étudiés dans les carcinomes bronchiques. L'expression de miR 16 a été étudiée par seulement 2 équipes aboutissant au résultat que l'expression de miR 16 est significativement diminuée dans les cellules tumorales par rapport au tissu sain (58) et qu'un taux élevé de miR 16 serait un facteur pronostique défavorable sur la survie globale et la survie sans progression (59). Notre étude confirme l'effondrement du taux de miR 16 dans les tissus tumoraux. L'étude de la corrélation avec la survie n'a pas été réalisée compte tenu du petit nombre d'échantillons disponibles, mais les résultats encourageants obtenus doivent nous inciter à inclure plus de patients afin de pouvoir évaluer la valeur pronostique de miR16. La corrélation entre miR16 et HuR, étudiés respectivement en RTqPCR et en Western-Blot a fait l'objet d'une analyse sur 10 « couples » de tumeurs et tissus sains d'origine mammaire (52). D'après les auteurs de cette étude sept de ces couples montraient une corrélation inverse entre HuR et miR 16, mais la signification statistique de cette corrélation n'est pas rapportée. Notre étude n'a pas mis en évidence de différence significative entre la baisse d'expression de miR 16 et la surexpression de HuR. La fiabilité de la quantification du signal immunohistochimique est peut-être en cause. Il serait utile de continuer notre étude par la quantification de HuR en Western Blot par densitométrie, en normalisant la quantité de HuR par rapport à une protéine de référence,

comme par exemple l'actine. Il faut pour cela disposer d'un matériel congelé de bonne qualité, très riche en cellules tumorales.

Concernant miR 519, si son rôle d'inhibiteur de la traduction de HuR a été démontré (54,60), son niveau d'expression n'avait, à notre connaissance, jamais été étudié dans une cohorte de CBNPC. Notre étude permet donc de mettre en évidence l'effondrement de miR 519 dans les cellules tumorales de CBNPC par rapport aux cellules du tissu sain. Le rôle pronostique de miR 519 reste à évaluer.

III. Etude des marqueurs de prolifération Ki67 et MCM6

Ki67 et MCM6 sont deux marqueurs de prolifération. Ki67 est un marqueur de prolifération reconnu dont la valeur pronostique dans les carcinomes bronchiques fait débat. Dans notre étude, Ki67, a un impact négatif sur la survie totale. C'est ainsi un facteur pronostique négatif, démontré en analyse multivariée ($p=0,0015$). Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par d'autres équipes (41).

Nous avons également démontré que le nombre de cellules marquées par l'anticorps anti-MCM6 était corrélé à une diminution de la survie globale, cette relation n'étant retrouvée qu'en analyse bivariée. La valeur pronostique de MCM6 dans les cancers pulmonaires n'a à notre connaissance jamais été rapportée dans la littérature. D'autres études sont probablement nécessaires afin de confirmer la valeur pronostique de ce marqueur prometteur.

Il est démontré à partir de données expérimentales, dans la littérature, que HuR stimule la prolifération cellulaire, ses cibles incluant des facteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire. De façon concordante avec ces données, nous retrouvons de façon significative une corrélation positive entre l'expression de HuR et l'indice de prolifération, mesuré avec l'anticorps anti-Ki-67 comme avec l'anticorps anti-MCM6. Au contraire, il est intéressant de noter qu'il existe une corrélation inverse entre méthyl-HuR et ces marqueurs de prolifération. Ainsi, la forme méthylée de HuR semble présenter des effets opposés à ceux de sa forme non méthylée, ce qui est concordant avec les résultats obtenus dans l'analyse de survie.

CONCLUSION

La surexpression de HuR dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains fait évoquer le rôle probable de HuR dans l'oncogénèse, bien que ses mécanismes de dérégulation ne soient pas tous élucidés.

Contrairement à certaines données de la littérature, en particulier sur les tumeurs bronchiques, nous mettons en évidence un impact pronostique défavorable de l'intensité d'expression de HuR nucléaire, mais pas de l'expression cytoplasmique.

La corrélation positive retrouvée entre l'expression de HuR et les marqueurs de prolifération Ki-67 et MCM6 est concordante avec l'activité stabilisatrice de HuR sur les protéines du cycle cellulaire, démontrée sur des modèles expérimentaux.

A l'inverse, la corrélation inverse entre ces marqueurs de prolifération et l'expression de méthyl-HuR fait supposer l'existence d'un rôle protecteur de méthyl-HuR, comme cela est également suggéré par la corrélation inverse entre niveau d'expression de méthyl-HuR et le stade T et par sa corrélation positive avec la survie. Le rôle exact de la méthylation de HuR sur sa fonction et sa localisation intra-cellulaire mériterait d'être investigué par des données expérimentales.

Enfin nous confirmons la nette diminution de miR 16 et miR 519 dans les tissus tumoraux, probablement à l'origine de la surexpression de HuR d'après les données expérimentales. Les rôles pronostiques de miR 16 et miR 519 restent à évaluer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Quoix E, Lemarié E. Épidémiologie du cancer bronchique primitif : aspects classiques et nouveautés. *Revue des Maladies Respiratoires*. oct 2011;28(8):1048 - 1058.
2. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. juin 2008;56(3):159 - 175.
3. 9559-dynamique-devolution-des-taux-de-mortalite-des-principaux-cancers-en-france.pdf [Internet]. [cité 6 mars 2013]. Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/9559-dynamique-devolution-des-taux-de-mortalite-des-principaux-cancers-en-france
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. févr 2011;6(2):244 - 285.
5. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The New Lung Cancer Staging System. *CHEST*. 1 juill 2009;136(1):260 - 271.
6. Kadota K, Suzuki K, Kachala SS, Zabor EC, Sima CS, Moreira AL, et al. A grading system combining architectural features and mitotic count predicts recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Mod. Pathol*. août 2012;25(8):1117 - 1127.
7. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol*. sept 2011;6(9):1496 - 1504.
8. Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J. Clin. Oncol*. 1 mai 2012;30(13):1438 - 1446.
9. Woo T, Okudela K, Mitsui H, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, et al. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. *Pathol. Int*. déc 2012;62(12):785 - 791.
10. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod. Pathol*. mai 2011;24(5):653 - 664.
11. Ma WJ, Furneaux H. Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13. *Human genetics*. 1996;99(1):32 - 3.

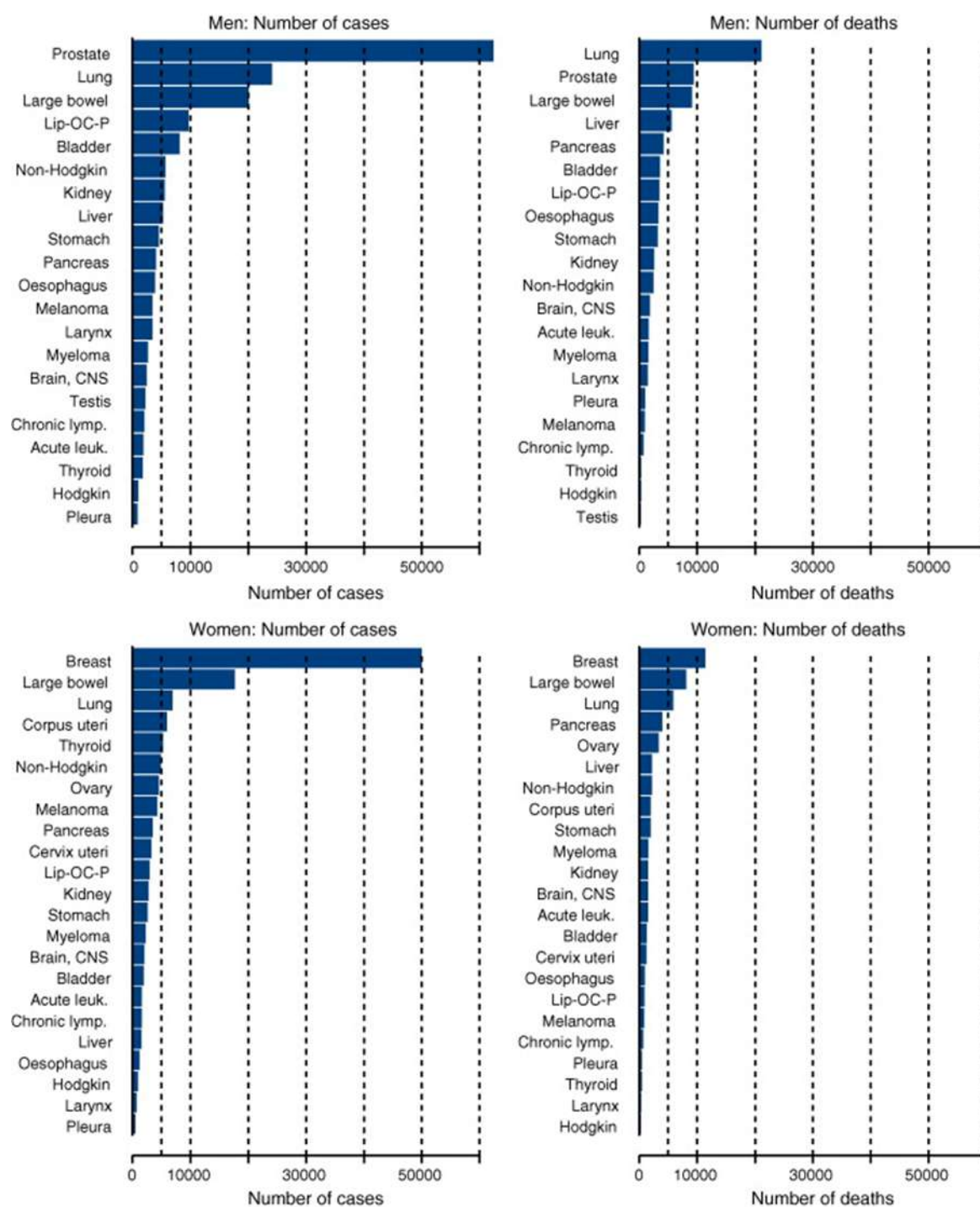
12. Ma W-J, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and Characterization of HuR, a Ubiquitously Expressed Elav-like Protein. *J. Biol. Chem.* 4 mai 1996;271(14):8144- 8151.
13. Maris C, Dominguez C, Allain FH-T. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal.* 2005;272(9):2118- 31.
14. Kenan DJ, Query CC, Keene JD. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* juin 1991;16(6):214- 220.
15. Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* nov 1995;20(11):465- 470.
16. Myer VE, Fan XC, Steitz JA. Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 15 avr 1997;16(8):2130- 2139.
17. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 26 juin 2008;65(20):3168- 3181.
18. Fan XC, Steitz JA. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 22 déc 1998;95(26):15293- 15298.
19. Doller A, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cellular signalling.* 2008;20(12):2165- 73.
20. Li H. Lipopolysaccharide-induced Methylation of HuR, an mRNA-stabilizing Protein, by CARM1. *Journal of Biological Chemistry.* 16 sept 2002;277(47):44623- 44630.
21. López de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol.* janv 2005;2(1):11- 13.
22. López de Silanes I, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES, et al. Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene.* 16 oct 2003;22(46):7146- 7154.
23. Heinonen M, Bono P, Narko K, Chang S-H, Lundin J, Joensuu H, et al. Cytoplasmic HuR Expression Is a Prognostic Factor in Invasive Ductal Breast Carcinoma. *Cancer Res.* 15 mars 2005;65(6):2157- 2161.
24. Denkert C, Weichert W, Winzer KJ, Müller BM, Noske A, Niesporek S, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clinical cancer research.* 2004;10(16):5580- 6.
25. Denkert C, Weichert W, Pest S, Koch I, Licht D, Köbel M, et al. 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 Res.* 1 janv 2004;64(1):189- 195.

26. Stoppoloni D, Cardillo I, Verdina A, Vincenzi B, Menegozzo S, Santini M, et al. Expression of the embryonic lethal abnormal vision-like protein HuR in human mesothelioma. *Cancer*. 2 oct 2008;113(10):2761- 2769.
27. Niesporek S, Kristiansen G, Thoma A, Weichert W, Noske A, Buckendahl A-C, et al. 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.* févr 2008;32(2):341- 347.
28. Cho N-P, Han H-S, Soh Y, Lee K-Y, Son H-J. Cytoplasmic HuR over-expression is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Pathology*. déc 2007;39(6):545- 550.
29. Yi X, Zhou Y, Zheng W, Chambers SK. HuR expression in the nucleus correlates with high histological grade and poor disease-free survival in ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* févr 2009;49(1):93- 98.
30. Vázquez-Chantada M, Fernández-Ramos D, Embade N, Martínez-Lopez N, Varela-Rey M, Woodhoo A, et al. HuR/methyl-HuR and AUF1 regulate the MAT expressed during liver proliferation, differentiation, and carcinogenesis. *Gastroenterology*. mai 2010;138(5):1943- 1953.
31. Blaxall BC, Dwyer-Nield LD, Bauer AK, Bohlmeier TJ, Malkinson AM, Port JD. Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. *Mol. Carcinog.* juin 2000;28(2):76- 83.
32. Wang J, Zhao W, Guo Y, Zhang B, Xie Q, Xiang D, et al. 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*. 2009;76(6):420- 429.
33. Wang J, Wang B, Bi J, Zhang C. Cytoplasmic HuR expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor outcome in lung cancer. *Medical Oncology*. 3 nov 2010;28(S1):577- 585.
34. Lauriola L, Granone P, Ramella S, Lanza P, Ranelletti FO. Expression of the RNA-binding protein HuR and its clinical significance in human stage I and II lung adenocarcinoma. *Histol. Histopathol.* mai 2012;27(5):617- 626.
35. Kim GY, Lim S-J, Kim YW. Expression of HuR, COX-2, and survivin in lung cancers; cytoplasmic HuR stabilizes cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinomas. *Mod. Pathol.* oct 2011;24(10):1336- 1347.
36. Seigneurin D, Guillaud P. [Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker]. *Pathol. Biol.* déc 1991;39(10):1020- 1028.
37. Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol.* févr 1989;1(1):25- 39.

38. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* mars 2000;182(3):311- 322.
39. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition - WHO - OMS - [Internet]. [cité 17 mars 2013]. Disponible sur: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4003#>
40. Luporsi E, André F, Spyrtatos F, Martin P-M, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.* avr 2012;132(3):895- 915.
41. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert A-P, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 13 déc 2004;91(12):2018- 2025.
42. Lee CY, Johnson RL, Wichterman-Kouznetsova J, Guha R, Ferrer M, Tuzmen P, et al. High-throughput screening for genes that prevent excess DNA replication in human cells and for molecules that inhibit them. *Methods.* juin 2012;57(2):234- 248.
43. Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Takeda K, Aburatani H, et al. Minichromosome maintenance (MCM) protein 4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* mai 2011;72(2):229- 237.
44. Yang J, Ramnath N, Moysich KB, Asch HL, Swede H, Alrawi SJ, et al. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 1 août 2006;6(1):203.
45. Werynska B, Pula B, Muszczynska-Bernhard B, Piotrowska A, Jethon A, Podhorska-Okolow M, et al. Correlation between expression of metallothionein and expression of Ki-67 and MCM-2 proliferation markers in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* sept 2011;31(9):2833- 2839.
46. Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, Yamaga K, Nosaka K, Araki K, et al. Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): Prognostic implication. *Lung Cancer.* août 2009;65(2):223- 229.
47. Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu S-F, Soudant M, Pinelli C, et al. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am. J. Surg. Pathol.* févr 2012;36(2):283- 291.
48. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv.* 27 nov 2007;452(1):1- 10.
49. Hammond SM. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1 nov 2006;58(1):63- 68.

50. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 9 juin 2005;435(7043):834 - 838.
51. Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res*. 6 juin 2012;31(1):54.
52. Xu F, Zhang X, Lei Y, Liu X, Liu Z, Tong T, et al. Loss of Repression of HuR Translation by miR-16 May Be Responsible for the Elevation of HuR in Human Breast Carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 12 juill 2010;111(3):727 - 734.
53. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 déc 2008;105(51):20297 - 20302.
54. Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, Mercken EM, Brennan SE, Wilson GM, et al. miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 2010;9(7):1354.
55. Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Viñolas N, Marrades RM, Gel B, et al. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Oncol*. avr 2011;103(5):411 - 415.
56. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. mai 2008;14(5):844 - 852.
57. Costantino CL, Witkiewicz AK, Kuwano Y, Cozzitorto JA, Kennedy EP, Dasgupta A, et al. The role of HuR in gemcitabine efficacy in pancreatic cancer: HuR Up-regulates the expression of the gemcitabine metabolizing enzyme deoxycytidine kinase. *Cancer Res*. 1 juin 2009;69(11):4567 - 4572.
58. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1 juill 2009;69(13):5553 - 5559.
59. Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Viñolas N, Marrades RM, Gel B, et al. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2011;103(5):411 - 5.
60. Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. oct 2010;1(2):214 - 229.

ANNEXE 1



D' après Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005, Belot et al

ANNEXE 2

Descriptor	Definition
Primary tumor (T)	
Tx	Tumor that cannot be assessed or is not detected radiologically or bronchoscopically but is proven histopathologically (malignant cells in bronchopulmonary secretions)
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor with the following characteristics:
	Size \leq 3 cm
	Airway location: in lobar bronchus or more distal airways
	Local invasion: none, surrounded by lung or visceral pleura
	Subdivisions: T1a (size \leq 2 cm) and T1b (2 cm < size \leq 3 cm)
T2	Tumor with size > 3 cm but \leq 7 cm or tumor with any of the following characteristics:
	Airway location: involvement of the main bronchus (distance to the carina is \geq 2 cm) or presence of atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to hilar region but does not involve the entire lung
	Local invasion: involvement of visceral pleura
	Subdivisions: T2a (3 cm < size \leq 5 cm) and T2b (5 cm < size \leq 7 cm)
T3	Tumor > 7 cm in size or tumor with any of the following:
	Airway location: tumor in the main bronchus (within 2 cm of the carina), or tumor with atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung
	Local invasion: direct invasion of chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, or parietal pericardium
	Satellite tumor nodule(s) in the same lobe as the primary tumor
T4	Tumor of any size invading any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, or carina; or tumor with satellite tumor nodule(s) in a different lobe, ipsilateral to that of the primary tumor
Lymph nodes (N)	
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	Absence of regional lymph node involvement
N1	Presence of metastasis to ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes (including direct extension to intrapulmonary nodes)
N2	Presence of metastasis to ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph nodes
N3	Presence of metastasis to any of the following lymph node groups: contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular nodes
Distant metastasis (M)	
M0	Absence of distant metastasis
M1	Presence of distant metastasis
	Subdivisions:
	M1a (satellite tumor nodule(s) in a contralateral lobe to that of the primary tumor or tumors with malignant pleural or pericardial effusion)
	M1b (distant metastasis)

D'après Seventh Edition of the Cancer Staging Manual and Stage Grouping of Lung Cancer: Quick Reference Chart and Diagrams Omar Lababede, MD; Moulay Meziane, MD; Thomas Rice, MD, FCCP CHEST. 2011;139(1):183-189. doi:10.1378/chest.10-1099

ANNEXE 3

T/M	Subgroup	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3	T3 _{>7}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 _{Inv}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 _{Satell}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4	T4 _{Inv}	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
	T4 _{Ipsi Nod}	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1	M1a _{Contra Nod}	IV	IV	IV	IV
	M1a _{Pl Disem}	IV	IV	IV	IV
	M1b	IV	IV	IV	IV

D'après The New Lung Cancer Staging System, Detterbeck et al.

ANNEXE 4 : protocole d'immunohistochimie :

- Après inclusion en paraffine, réalisation de coupes fines (5µm) montées à l'eau sur des lames de verre Polysine™ (LABONORD S.A, Templemars, FR)
- Séchage pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56 °C pendant quelques heures.
- Le déparaffinage et le démasquage des sites antigéniques sont réalisés dans le même temps dans un bain-marie PT Link™ DAKO en tampon citrate 6,0 pendant 20 minutes.
- Après dilution des anticorps primaires dans le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM 830), les lames subissent la technique de détection immunohistochimique.

La technique Flex + comprend les étapes suivantes :

- rinçage avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1) pendant 5 min
- blocage des peroxydases endogènes avec le réactif EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking Reagent (SM 801) soit avec un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN3 15mmol/L et un détergent pendant 5 min
- rinçage pendant 5 min
- incubation avec l'anticorps primaire pendant 1h
- rinçage pendant 5 min
- anticorps secondaire avec EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) soit une solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien pendant 15 min
- rinçage pendant 5 min
- polymère marqué avec EnVision™ FLEX/HRP (SM802) soit un dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules secondaires de chèvre dirigées contre les immunoglobulines de lapin et de souris dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur pendant 20 min
- rinçage pendant 2 x 5 min
- chromogène substrat avec EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM 803) soit une solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène diaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur pendant 10 min
- rinçage pendant 5 min
- contre-coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) soit une solution aqueuse d'hématoxyline pendant 5 min
- rinçage pendant 5 min à l'eau distillée
- montage à l'Eukitt® (LABONORDS.A., Templemars, FR) ; après déshydratation par des bains successifs d'éthanol 0 96° et 100°.

ANNEXE 5 : extraction des protéines pour la technique de Western Blot

- Toutes les étapes se font à +4°C sur de la glace et les liquides ainsi que le matériel sont maintenus au froid
- Déstocker les prélèvements de -80°C et les placer dans le cryostat à -30°C
- Débiter en coupes de 20 μ d'épaisseur et les placer dans des tubes Falcon stériles de 50 ml et les conserver à +4°C sur de la glace
- Vérification de la qualité des prélèvements par technique extemporanée
- Rincer les coupes de tissus dans du PBS 1X stérile froid
- Centrifuger 5mn à +4°C à 5000 T/m
- Répéter cette étape jusqu'à élimination de toute trace d'hémoglobine
- Reprendre le culot cellulaire dans le tampon C (Tris HCl 2M pH=8 :10 mM, KCl 3M :20 mM, EDTA 0,5M pH=8 : 1,5 mM, Co inh 500 X, PMSF 0,1M, MgCl₂ 1M, glycérol 99% : 10%) en ajustant le volume à la quantité de tissu
- Transférer le tout dans un tube de Dounce et broyer avec le piston loose avec une dizaine d'allers-retours
- Vérifier la qualité de la lyse cytoplasmique par une coloration des débris cellulaires (Hématoxyline-Eosine) au besoin ajuster le broyage avec le piston tight ou allonger le temps
- Transférer dans des tubes de 2 ml
- Centrifuger 5mn à +4°C à 5000T/m dans un rotor fixe
- Garder ou éliminer le surnageant qui contient les protéines cytosoliques
- Reprendre le culot avec un volume approprié de tampon N (Tris HCl 2M pH=8 : 10 mM, KCl 3M : 0,5 M, EDTA 0,5M pH=8 : 1,5 mM, Co inh 500 X, PMSF 0,1M, glycérol 99%)
- Broyer avec le piston loose puis reprendre avec le piston tight
- Attendre 30mn en broyant de temps en temps
- Les temps de broyage et les types de piston sont à adapter en fonction de chaque tissu
- Transférer dans des tubes de 2 ml
- Centrifuger 30mn à +4°C à 14000T/m
- Vérifier la lyse nucléaire (au besoin augmenter la concentration en KCl)
- Prélever le surnageant et le transférer dans des tubes Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore) en vue d'une concentration protéique
- Centrifuger suivant les indications du fabricant
- Une fois le volume de concentration voulu obtenu doser les protéines
- Aliquoter les protéines et les stocker à -80°C

ANNEXE 6 : Technique de Western-Blot

PREPARATION DU GEL D'ACRYLAMIDE

- Composants des gels : Acrylamide (37,5/1 30%), Tris HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, H₂O, APS 10%, TEMED)
- Réalisation d'un gel de séparation à 10% et d'un gel de concentration à 4 %
- Couler les gels avec les plaques et peignes de dimension appropriée en commençant par le gel de séparation, recouvrir de propanol, attendre la polymérisation, enlever le propanol, rincer à l'eau, absorber le maximum d'eau avec un filtre puis couler le gel de concentration.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

- 20 µg de protéines dans un volume final de 25 µl au maximum (volume limité en fonction des puits pour des peignes de 0,75 mm)
- Non Reducing Sample Buffer 5X (Thermo Scientific) : concentration finale 1X
- DTT 1 M stock : concentration finale 0,1 M
- Mélanger et porter à ébullition pendant 5 mn

MIGRATION

- Mettre les gels dans la cuve avec le tampon de migration tris glycine SDS 1X (solution mère 10X Biorad), rincer les puits
- Déposer les échantillons, ne pas oublier le marqueur de poids moléculaire
- Mettre de la glace autour de la cuve
- Faire migrer à 100 V jusqu'au gel de séparation
- Faire migrer à 200 V jusqu'à ce que le colorant de front de migration sorte du gel

TRANSFERT

- Faire tremper dans le tampon de transfert froid les « pads », 4 papiers filtres et la membrane de PVDF (repérer en coupant un coin) qui aura trempé 15 secondes dans du méthanol (le PVDF est hydrophobe)
- Démonter le gel et l'immerger quelques minutes dans le tampon de transfert
- Procéder au montage du « sandwich » en respectant la polarité – vers + (- côté noir de la plaque), empiler dans l'ordre : 1 pad (éliminer les bulles éventuelles), 2 papiers filtres, le gel, la membrane « renversée », 2 papiers filtres, 1 pad
- Fermer le montage et faire migrer (attention à la polarité) dans le tampon avec le bac à glaçon 1 H à 100 V, entourer le bac de migration de glace pilée

BLOCAGE

Démonter le sandwich et faire tremper les membranes pendant 2 H sous une très légère agitation dans la solution de blocage (TRIS HCl 1 M pH 7,6, NaCl 5M, Tween 20 5 M, Lait en poudre (Biorad) : 5% final)

IMMUNODETECTION

- Déposer la membrane égouttée sur une plaque de verre et déposer l'anticorps dilué dans la solution de blocage
- Incuber en chambre humide sur la nuit à 4°C
- Laver 4X pendant 1H dans la solution TNT (TRIS HCl 1 M pH 7,6, NaCl 5M, Tween 20 5 M, H₂O).

- Egoutter la membrane, la repositionner sur la plaque de verre et déposer l'anticorps secondaire
- Incuber 1H à température ambiante
- Laver 4X pendant 1H dans la solution TNT

REVELATION

- Utilisation soit de la solution Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) ou de la solution SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoScientific) suivant les recommandations du fournisseur.
- Temps de révélation à adapter à chaque cas.

VU

NANCY, le **20 mars 2013**

Le Président de Thèse

NANCY, le **25 mars 2013**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur J.-M. VIGNAUD

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE N°6105

NANCY, le 29/03/2013

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Introduction : HuR joue un rôle important dans la régulation de nombreux ARN messagers impliqués dans le cycle cellulaire et donc la prolifération tumorale. Ki-67 et MCM6 sont deux protéines exprimées pendant le cycle cellulaire et utilisées comme marqueurs de prolifération. La protéine HuR est elle-même régulée négativement par des petits ARN, les micro-ARNs. Le but de cette étude est d'analyser le niveau d'expression de HuR, méthyl-HuR, Ki-67 et MCM6 et des micro-ARNs 16 et 519 dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC).

Matériels et méthodes : L'étude immunohistochimique de HuR, méthyl-HuR, Ki-67 et MCM6 a été réalisée sur 190 CBNPC, à partir de matériel inclus en paraffine. Le niveau d'expression des micro-ARNs 16 et 519 a été étudié sur 20 CBNPC par RT-qPCR, à partir de matériel congelé. Les données cliniques et pathologiques ont été extraites de la cohorte « Cancers bronchiques et mésothéliomes pleuraux » du Centre de ressources biologiques du CHU de Nancy.

Résultats : L'expression globale et cytoplasmique de HuR est augmentée dans les cellules tumorales de CBNPC. Le niveau d'expression nucléaire de HuR au sein des cellules tumorales est un facteur de mauvais pronostic ($p=0,0315$). HuR est corrélé positivement avec les marqueurs de prolifération Ki-67 et MCM6. A l'inverse, méthyl-HuR est corrélé négativement avec les facteurs de prolifération et serait un facteur de bon pronostic ($p=0,0360$). Les micro-ARNs miR 16 et miR 519 sont effondrés dans les tissus tumoraux par rapport au tissu sain ($p<0,001$).

Conclusion : HuR est surexprimé dans les cellules de CBNPC. Un fort niveau d'expression nucléaire de HuR a un impact négatif sur la survie globale, à l'inverse de méthyl-HuR. La corrélation de HuR avec les facteurs de prolifération semble confirmer son rôle stabilisateur des protéines du cycle cellulaire. La baisse du niveau d'expression de miR 16 et miR 519 est probablement à l'origine de la surexpression de HuR dans les tissus tumoraux.

TITRE EN ANGLAIS :

HuR (ELAV-like 1) dysregulation, and proliferation in non small cell lung carcinomas.

THÈSE: MÉDECINE SPÉCIALISÉE- ANNÉE 2013

MOTS CLEFS : HuR, dérégulation, micro- ARN, Ki-67, MCM6, carcinome, poumon

INTITULÉ et ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
