

Université de Montréal

**Les protéines Staufen et leurs rôles dans la régulation
posttranscriptionnelle de l'expression des gènes, la réponse
aux dommages à l'ADN et le cycle cellulaire**

par

Véronique Trépanier

Département de Biochimie et de Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)
en Biochimie

Mars, 2014

© Véronique Trépanier, 2014

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Les protéines Staufen et leurs rôles dans la régulation
posttranscriptionnelle de l'expression des gènes, la réponse aux
dommages à l'ADN et le cycle cellulaire**

présentée par :

Véronique Trépanier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Pascal Chartrand, président-rapporteur

Dr. Luc DesGroseillers, directeur de recherche

Dr. Muriel Aubry, membre du jury

Dr. François Bachand examinateur externe

Dr Guy Lemay, représentant du doyen

Résumé

Les différents mécanismes de régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes sont de plus en plus reconnus comme des processus essentiels dans divers phénomènes physiologiques importants, comme la prolifération cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN. Deux des protéines impliquées dans ce type de régulation sont Staufen1 (Stau1) et Staufen2 (Stau2). Elles sont des protéines de liaison à l'ARN double brin qui contribuent au transport de l'ARN messager (ARNm), au contrôle de la traduction, à l'épissage alternatif et sont responsables de la dégradation de certains ARNm spécifiques. Les protéines Staufen peuvent en effet s'associer à des ARNm bien précis, d'autant plus que, majoritairement, Stau1 et Stau2 ne se retrouvent pas en complexe avec les mêmes cibles. De nombreuses évidences récentes montrent l'implication de divers mécanismes de régulation posttranscriptionnelle dans la réponse aux dommages à l'ADN, plusieurs protéines de liaison à l'ARN y participant d'ailleurs. De façon importante, cette réponse dicte un ou plusieurs destin(s) à la cellule qui doit réagir à la suite de dommages à l'intégrité de son ADN: réparation de l'ADN, arrêt de la prolifération cellulaire, apoptose. Nous avons donc fait l'hypothèse que l'expression de Stau1 et/ou de Stau2 pourrait être affectée en réponse à un stress génotoxique, ce qui pourrait avoir comme conséquence de moduler l'expression et/ou la stabilité de leurs ARNm cibles. De même, notre laboratoire a récemment observé que l'expression de Stau1 varie pendant le cycle cellulaire, celle-ci étant plus élevée jusqu'au début de la mitose (prométaphase), puis elle diminue alors que les cellules complètent leur division. Par conséquent, nous avons fait l'hypothèse que Stau1 pourrait lier des ARNm de façon différentielle dans des cellules bloquées en prométaphase et dans des cellules asynchrones.

D'un côté, en employant la camptothécine (CPT), une drogue causant des dommages à l'ADN, pour traiter des cellules de la lignée de cancer colorectal HCT116, nous avons observé que seule l'expression de Stau2 est réduite de façon considérable, tant au niveau de la protéine que de l'ARNm. L'utilisation d'autres agents cytotoxiques a permis de confirmer cette observation initiale. De plus, nous avons constaté que l'expression de Stau2 est touchée même dans des conditions n'engendrant pas une réponse apoptotique, ce qui suggère que cette

déplétion de Stau2 est possiblement importante pour la mise en place d'une réponse appropriée aux dommages à l'ADN. D'ailleurs, la surexpression de Stau2 conjointement avec le traitement à la CPT entraîne un retard dans l'induction de l'apoptose dans les cellules HCT116. Nous avons aussi montré que la diminution de l'expression de Stau2 est due à une régulation de sa transcription en réponse au stress génotoxique, ce pourquoi une région minimale du promoteur putatif de Stau2 est nécessaire. Également, nous avons identifié que le facteur de transcription E2F1, couramment impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, peut contrôler l'expression de Stau2. Ainsi, E2F1 permet une augmentation de l'expression de Stau2 dans des cellules non traitées, mais cette hausse est abolie dans des cellules traitées à la CPT, ce qui suggère que la CPT pourrait agir en inhibant l'activation transcriptionnelle de Stau2 par E2F1. Enfin, nous avons observé que certains ARNm associés à Stau2, et codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et l'apoptose, sont exprimés différemment dans des cellules traitées à la CPT et des cellules non traitées.

D'un autre côté, nous avons identifié les ARNm associés à Stau1 lors de la prométaphase, alors que l'expression de Stau1 est à son niveau le plus élevé pendant le cycle cellulaire, grâce à une étude à grande échelle de micropuces d'ADN dans des cellules HEK293T. Nous avons par la suite confirmé l'association entre Stau1 et certains ARNm d'intérêts, donc codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire et/ou le déroulement de la mitose. Une comparaison de la liaison de ces ARNm à Stau1 dans des cellules bloquées en prométaphase par rapport à des cellules asynchrones nous a permis de constater une association préférentielle dans les cellules en prométaphase. Ceci suggère une augmentation potentielle de la régulation de ces ARNm par Stau1 à ce moment du cycle cellulaire.

Les données présentées dans cette thèse indiquent vraisemblablement que la régulation posttranscriptionnelle de l'expression génique contrôlée par les protéines Staufen se fait en partie grâce à la modulation de l'expression de Stau1 et de Stau2 en fonction des conditions cellulaires. Nous envisageons alors que cette variation de l'expression des protéines Staufen ait des conséquences sur des sous-ensembles d'ARNm auxquels elles sont liées et que de cette

façon, elles jouent un rôle pour réguler des processus physiologiques essentiels comme la réponse aux dommages à l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire.

Mots-clés : Staufen, ARN messenger, régulation posttranscriptionnelle de l'expression génique, réponse aux dommages à l'ADN, apoptose, régulation transcriptionnelle, cycle cellulaire.

Abstract

The various mechanisms of post-transcriptional regulation of gene expression are more and more recognized as essential processes in diverse important physiological phenomena, like cell proliferation and the DNA damage response (DDR). Two of the proteins implicated in this type of regulation are Staufen1 (Stau1) and Staufen2 (Stau2). They are double-stranded RNA binding proteins contributing to messenger RNA (mRNA) transport, translation control, alternative splicing and are responsible for the degradation of some specific mRNAs. The Staufen proteins are indeed able to associate with particular mRNAs. Interestingly, Stau1 and Stau2 predominantly form complexes with different targets. Recent evidences show the implication of various post-transcriptional regulation mechanisms in the DDR, moreover several RNA binding proteins are involved. Importantly, this response dictates one or several cell fates following damage to the integrity of the cell's DNA: DNA repair, cell proliferation arrest, apoptosis. We hypothesized that Stau1 and/or Stau2 expression could be affected in response to genotoxic stress, which could consequently modulate the expression and/or the stability of their mRNA targets. Also, our laboratory has recently observed that Stau1 expression varies during the cell cycle. It is elevated up to the beginning of mitosis (prometaphase) and it decreases as cells complete their division. We therefore hypothesized that Stau1 could differentially bind mRNAs in cells blocked in prometaphasis and in asynchronous cells.

On the one hand, by using camptothecin (CPT), a DNA damaging agent, to treat cells from the colorectal cancer cell line HCT116, we observed that only the expression of Stau2 is considerably reduced, both at the level of the protein and that of the mRNA. The use of other cytotoxic agents allowed us to confirm this initial observation. We also noted that Stau2 expression is down-regulated even in conditions that do not induce apoptosis, suggesting that the decrease in Stau2 expression may be required for a proper DDR. Indeed, Stau2 over-expression together with the CPT treatment causes a delay in apoptosis induction in HCT116 cells. We also showed that Stau2 down-regulation is due to the regulation of its transcription in response to the genotoxic stress, which necessitates a minimal region in Stau2's putative

promoter. Besides, we identified the E2F1 transcription factor, commonly implicated in the DDR, as a regulator of Stau2 expression. E2F1 thus stimulates an increase in Stau2 expression in non-treated cells, but this up-regulation is abolished in CPT-treated cells, which suggests that CPT could act by inhibiting Stau2 transcriptional activation by E2F1. Finally, we observed that some Stau2-associated mRNAs, which code for proteins implicated in the DDR and apoptosis, are differentially expressed in CPT-treated cells compared to non-treated cells.

On the other hand, we identified Stau1-associated mRNAs during prometaphase, when Stau1 expression is at its highest level in the cell cycle, by performing a large-scale study using DNA microarrays in HEK293T cells. We subsequently confirmed the association between Stau1 and some mRNAs of interest, mainly coding for proteins involved in the regulation of cell proliferation and/or mitosis progression. A comparison of the association between Stau1 and these mRNAs in prometaphase-blocked cells with that in asynchronous cells allowed us to notice a preferential association in prometaphase-blocked cells. This suggests a potential increase of the regulation of these mRNAs by Stau1 at that point of the cell cycle.

The data presented in this thesis indicate that in all likelihood the post-transcriptional regulation of gene expression controlled by the Staufen proteins happens in part thanks to the modulation of Stau1 and Stau2 expression according to the cellular conditions. We then contemplate that this fluctuation in Staufen proteins expression has consequences on mRNA subsets with which they associate, and that this may mean they have an important role to play in regulating essential physiological processes like DDR and cell cycle progression.

Keywords : Staufen, messenger RNA, post-transcriptional regulation of gene expression, DNA damage response, apoptosis, transcriptional regulation, cell cycle.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Abréviations.....	xv
Remerciements.....	xx

Introduction.....	1
1. Le cancer et le traitement par chimiothérapie.....	1
1.1 Historique de la chimiothérapie	1
1.2 Différentes drogues, différents effets	3
1.2.1 Les dommages à l'ADN comme traitement contre le cancer.....	3
1.2.2 Les camptothécines, inhibiteurs de la topoisomérase I.....	5
2. La réponse aux dommages à l'ADN	9
2.1 La réparation de l'ADN	11
2.1.1 Divers mécanismes de réparation.....	11
2.1.2 Voies et molécules impliquées dans la réparation.....	13
2.1.3 Exploiter les défauts de la réparation de l'ADN dans les tumeurs.....	16
2.2 L'inhibition de la prolifération cellulaire par l'activation de points de contrôle	18
2.2.1 Le cycle cellulaire.....	19
2.2.2 Le contrôle par modifications posttraductionnelles : Chk1/2 et Cdc25.....	21
2.2.3 Le contrôle par activité transcriptionnelle : p53 et p21	23
2.3 La sénescence.....	24
3. La mort cellulaire programmée.....	27
3.1 L'apoptose.....	27
3.1.1 La voie intrinsèque.....	28
3.1.2 La voie extrinsèque.....	32

3.1.3 Les caspases	33
3.1.4 Autres régulateurs de l'apoptose	34
3.1.5 Traitement de tumeurs résistantes à l'apoptose.....	37
3.2 Les autres formes de mort cellulaire programmée	38
3.2.1 La nécrose programmée	38
3.2.2 L'autophagie.....	40
4. Les grands régulateurs de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN : p53 et E2F	41
4.1 p53 : régulation sélective de l'apoptose?.....	41
4.1.1 La régulation de la transcription par p53 et sa fonction dans l'apoptose.....	43
4.1.2 Des rôles apoptotiques de p53 indépendants de la transcription ?.....	47
4.1.3 Les mutations de p53 dans les cancers et les traitements associés.....	48
4.2 La famille E2F : rôles multiples.....	50
4.2.1 La régulation de l'activité d'E2F1 en réponse à des dommages à l'ADN.....	52
4.2.2 Les fonctions d'E2F1 dans l'apoptose.....	54
4.2.3 Le rôle d'E2F1 dans la chimiorésistance	56
5. La régulation posttranscriptionnelle dans la réponse aux dommages à l'ADN et l'apoptose	58
5.1 Survol de la régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes	59
5.1.1 Entre la transcription et la traduction.....	59
5.1.2 Les complexes ribonucléoprotéiques et les opérons d'ARN	62
5.2 Les dommages à l'ADN et la régulation posttranscriptionnelle de l'expression génique	63
5.2.1 L'épissage alternatif.....	64
5.2.2 La régulation de la stabilité des ARNm et de leur traduction	66
5.2.3 Les miARN dans la réponse aux dommages à l'ADN	70
6. Stau1 et Stau2 : des protéines multifonctionnelles.....	73
6.1 La découverte et les rôles de Stau1 chez la drosophile	73
6.2 Caractérisation de Stau1 et Stau2 chez les mammifères	75
6.3 L'interaction de Stau1 et de Stau2 avec leurs ARNm cibles	78
6.4 Rôles de Stau1 et Stau2 chez les mammifères	80
6.4.1 Le transport de l'ARN	81

6.4.2 La régulation de la traduction.....	82
6.4.3 La dégradation de l'ARN.....	83
6.4.4 Autres fonctions.....	87
7. Hypothèses et objectifs de recherche	88
Matériel et méthodes.....	90
1. Implication des protéines Staufen dans la réponse aux dommages à l'ADN	90
1.1 Plasmides et anticorps.....	90
1.2 Culture et traitements cellulaires.....	91
1.3 Transfections et infections	91
1.4 Immunobuvardages de type Western	92
1.5 Isolation d'ARN et RT-qPCR.....	92
1.6 Essais luciférase	94
2. Identification des ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase.....	94
2.1 Plasmide et anticorps	94
2.2 Culture cellulaire, synchronisation des cellules et transfection	95
2.3 Immunoprécipitations et immunobuvardages de type Western.....	95
2.4 Analyse de micropuces	96
2.5 Validation des micropuces par RT-qPCR.....	97
Résultats	98
1. Implication des protéines Staufen dans la réponse aux dommages à l'ADN	98
1.1 L'expression de Stau2, mais pas de Stau1, est modulée en réponse à un stress génomique.....	98
1.2 La CPT affecte l'expression de l'ARNm codant pour Stau2, mais pas celle de l'ARNm codant pour Stau1.....	100
1.3 La diminution de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT se produit avant que l'apoptose ne soit mise en place.....	101
1.4 L'expression de Stau2 est aussi régulée par divers autres agents cytotoxiques.....	104
1.5 L'expression de Stau2 non régulée par son promoteur natif n'est pas affectée par la CPT	107

1.6 L'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur putatif de Stau2 peut être modulée par la CPT	110
1.7 La régulation de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT se fait grâce à la présence d'une région minimale dans son promoteur	114
1.8 Le facteur de transcription E2F1 est impliqué dans la régulation de l'expression de Stau2.....	117
1.9 Le traitement à la CPT inhibe l'effet activateur d'E2F1 sur l'expression de Stau2.....	119
1.10 La surexpression de Stau2 entraîne un retard dans l'apoptose induite par le traitement à la CPT	122
1.11 Plusieurs ARNm associés à Stau2 codent pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN	124
2. Identification des ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase.....	127
2.1 Mise en contexte.....	127
2.2 Analyse par micropuces des ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase	128
2.3 Validation de l'interaction en prométaphase entre Stau1 et certains ARNm codant pour des protéines du cycle cellulaire	141
Discussion	146
1. Stau2 et la réponse aux dommages à l'ADN	146
1.1 Caractérisation de la diminution de l'expression de Stau2 en réponse à un stress génotoxique.....	146
1.1.1 La diminution de l'expression de Stau2 par rapport à l'induction de l'apoptose... 147	
1.1.2 La diminution de l'expression de Stau2 n'est pas une conséquence de l'utilisation de la CPT	148
1.1.3 L'expression de Stau1 n'est pas affectée par un stress génotoxique	150
1.1.4 L'expression de Stau2 est affectée au niveau de la transcription en réponse à la CPT	151
1.2 Régulation de la transcription de Stau2 en réponse aux dommages à l'ADN	153
1.2.1 Identification du promoteur putatif de Stau2 et d'une région importante pour sa régulation	154

1.2.2 Le facteur de transcription E2F1 est important dans le contrôle de la transcription de Stau2	157
1.2.3 Lien entre les dommages à l'ADN, E2F1 et la régulation de la transcription de Stau2	160
1.3 Rôle de Stau2 et de la diminution de son expression dans la réponse aux dommages à l'ADN?	164
1.3.1 Association entre Stau2 et des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN	165
1.3.2 Stau2 a-t-elle un rôle antiapoptotique?	168
1.3.3 Autres rôles possibles pour Stau2 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	169
2. Stau1 et ses ARNm associés pendant la prométaphase.....	171
2.1 Interaction entre Stau1 et des ARNm codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire	172
2.2 Rôle de Stau1 pendant la prométaphase?	175
Conclusion	178
Bibliographie	180
Annexe I : Liste des contributions à des articles	i

Liste des tableaux

Résultats

Tableau I. ARNm associés avec Stau2 et codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans l'apoptose.....	125
Tableau II. Liste des ARNm dont l'expression en prométaphase varie de plus de deux fois entre les cellules exprimant Stau1 ⁵⁵ -FLAG et les cellules contrôles.	130
Tableau III. Liste des ARNm associés à Stau1 ⁵⁵ -FLAG pendant la prométaphase dans des cellules HEK293T.....	131

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Résumé des types de lésions à l'ADN causées par divers agents chimiothérapeutiques.....	4
Figure 2. Structures chimiques de la camptothécine et de ses dérivés.....	6
Figure 3. Collision entre la fourche de réplication et le complexe ternaire ADN-topo I-CPT. ..	8
Figure 4. Schéma simplifié de la réponse aux dommages à l'ADN.	10
Figure 5. Divers mécanismes de réparation de l'ADN permettent de répondre à différents types de dommages.....	12
Figure 6. Modèle du recrutement des protéines ATM, DNA-PKcs et ATR sur les sites de dommages à l'ADN.....	13
Figure 7. Rôle de la phosphorylation de H2AX et du recrutement de MDC1 dans la propagation du signal initié par ATM sur un site de dommage à l'ADN.....	16
Figure 8. L'effet de l'inhibition de PARP dans des cellules normales par rapport à des cellules cancéreuses déficientes en BRCA.....	18
Figure 9. Le cycle cellulaire, les complexes Cdk-cyclines impliqués et les points de contrôle reliés au dommage à l'ADN.....	20
Figure 10. Schéma simplifié de la voie intrinsèque de l'apoptose.....	29
Figure 11. Structures de différentes protéines membres de la famille Bcl-2.	30
Figure 12. Modèles d'activation des effecteurs Bax et Bak par les protéines BH3.....	31
Figure 13. Interactions entre les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	36
Figure 14. Le Ripoptosome et son influence sur le déclenchement de l'apoptose ou de la nécrose.	39
Figure 15. La régulation de p53 et de ses gènes cibles.	42
Figure 16. Certaines modifications de p53 peuvent expliquer la spécificité de sa fonction.	44
Figure 17. Mise au point de nouveaux composés pharmacologiques permettant de stimuler les fonctions de p53 dans la suppression de tumeurs.	50
Figure 18. La régulation des facteurs activateurs de la famille E2F en réponse aux dommages à l'ADN.	53

Figure 19. Les différentes étapes du métabolisme d'un ARNm entre sa transcription et sa traduction.	60
Figure 20. Les miARN dans la réponse aux dommages à l'ADN.	71
Figure 21. Structure du complexe entre le dsRBD3 de dStau et une tige-boucle de 12 paires de bases obtenue par RMN à haute résolution.....	74
Figure 22. Représentation schématisée des différents isoformes de Stau1 et Stau2.	76
Figure 23. Un modèle pour le mécanisme du SMD.....	86

Résultats

Figure 24. L'expression de Stau2, mais pas de Stau1 est régulée en réponse à des dommages à l'ADN.	99
Figure 25. L'expression de l'ARNm codant pour Stau2 diminue en réponse à des dommages à l'ADN, mais pas celle de l'ARNm codant pour Stau1.....	101
Figure 26. La diminution de l'expression de Stau2, tant au niveau de la protéine que de l'ARNm, se produit avant que l'apoptose ne soit déclenchée.	103
Figure 27. Effets de divers agents cytotoxiques sur l'expression de Stau2.....	106
Figure 28. Lorsque la transcription de Stau2 est sous le contrôle d'un promoteur CMV, la CPT ne régule pas son expression.....	109
Figure 29. La région riche en GC du promoteur putatif de Stau2 assure l'expression de la luciférase.	112
Figure 30. Le promoteur putatif de Stau2 contrôle la diminution de l'expression de la luciférase en réponse à la CPT.....	113
Figure 31. La séquence entre -68 et -195 en amont du site d'initiation de la transcription de Stau2 est nécessaire pour la régulation de l'expression en réponse à la CPT.....	115
Figure 32. L'activation d'E2F1 entraîne une augmentation de l'expression de Stau2.	118
Figure 33. L'effet activateur d'E2F1 sur l'expression de Stau2 est inhibé à la suite d'un traitement à la CPT.....	120
Figure 34. L'expression de la luciférase contrôlée par le promoteur de Stau2 est stimulée par l'activation d'E2F1 et la CPT empêche cette stimulation.	122
Figure 35. La présence de S2F induit un délai dans l'induction de l'apoptose causée par le traitement à la CPT.....	123

Figure 36. Effet d'un traitement à la CPT sur des ARNm associés à Stau2 et codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN..... 126

Figure 37. Analyse par micropuces de cellules HEK293T exprimant Stau1⁵⁵-FLAG lors de la proméphase..... 130

Figure 38. Validation par RT-qPCR de l'interaction entre Stau1 et certains ARNm sélectionnés. 144

Discussion

Figure 39. La déplétion de l'expression de Stau2 en même temps que le traitement à la CPT entraîne une petite augmentation de la quantité de PARP clivé. 169

Abréviations

5FU :	5-fluoro-uracile
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGO :	Protéine Argonaute
AIF :	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
APAF1 :	<i>Apoptosis Protease-Activating Factor 1</i>
APC/C :	Complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome
ARE :	Séquence riche en AU (<i>AU-Rich Element</i>)
Arf1 :	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ASPP :	<i>Apoptosis-Stimulating Proteins of p53</i>
ATM :	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR :	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATRIP :	<i>ATR-interacting protein</i>
AUF1 :	<i>AU-rich element RNA-binding protein 1</i>
BAC :	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BER :	Réparation de l'ADN via l'excision d'une base
BH :	Domaine d'homologie à Bcl-2
BRCA1 :	<i>Breast Cancer 1</i>
BRET :	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
CAD :	ADNase activée par les caspases
CARD :	Domaine de recrutement et d'activation de caspase
Cdc25 :	<i>Cell division cycle 25</i>
Cdk :	Kinase dépendante des cyclines
c-FLIP :	<i>cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-Inhibitory Protein</i>
ChIP :	Immunoprécipitation de chromatine
Chk :	<i>Checkpoint kinase</i>
CPT :	Camptothécine

Crm1 :	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i>
CYCS :	Cytochrome c
DD :	<i>Death Domaine</i> ou <i>Domaine de mort</i>
DED :	<i>Death Effector Domain</i>
DFFB :	<i>DNA fragmentation factor</i> , 40 kDa, polypeptide beta
DIABLO :	<i>Direct IAP-Binding protein with Low PI</i>
DISC :	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMEM :	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DMPK :	<i>Dystrophia Myotonica Protein Kinase</i>
DNA-PK :	Kinase dépendante de l'ADN
DNA-PKcs :	Sous-unités catalytiques de la kinase dépendante de l'ADN
Doxo :	Doxorubicine
DSB :	Bris double brin dans l'ADN
dsRBD :	Domaine de liaison à l'ARN double-brin
DYRK2 :	<i>Dual-specificity Tyrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 2</i>
EJC :	Complexe de jonction d'exons
EWS :	<i>Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1</i>
FADD :	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FISH :	Hybridation <i>in situ</i> utilisant la fluorescence
FMRP :	<i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
Gadd45 α :	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible 45α</i>
GRP78/BiP :	78 kDa <i>Glucose-Regulated Protein/Binding immunoglobulin Protein</i>
HIF-1 α :	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1α</i>
HIPK2 :	<i>Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2</i>
HR :	Recombinaison homologue
HuR :	<i>HUman antigen R</i>
IAP :	Protéine inhibitrice de l'apoptose
ICAD :	Inhibiteur de CAD
IP :	Immunoprécipitation/Immunoprécipité
IRAlu :	Séquence Alu inversée répétée
IRES :	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>

kDa :	KiloDalton
KSRP :	<i>KH-type Splicing Regulatory Protein</i>
lincARN :	Long ARN non-codant intergénique
lncARN :	Long ARN non-codant
MAPK :	Kinase activée par les mitogènes
MDC1 :	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
miARN :	MicroARN
MK2 :	MAPKAP Kinase 2
MRN :	Complexe Mre11-Rad50-Nbs1
NER :	Réparation de l'ADN via l'excision de nucléotides
NES :	Signal d'export nucléaire
NHEJ :	Ligature des bouts d'ADN non homologues
NLS :	Signal de localisation nucléaire
NMD :	Dégradation induite par codon non-sens
OHT :	4-hydroxytamoxifène
p53AIP1 :	<i>p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1</i>
PARP :	Polymérase poly (ADP-ribose)
P/CAF :	<i>p300/CBP-Associated Factor</i>
PCBP4 :	<i>Poly(rC)-Binding Protein 4</i>
PIKK :	Kinases reliées aux phosphoinositide-3 kinases
PKR :	Protéine Kinase R
PNRC2 :	<i>Proline-rich Nuclear Receptor Coactivator 2</i>
PPP6C :	Protéine phosphatase 6, sous-unité catalytique
pRb :	Protéine du rétinoblastome
PTC :	Codon de terminaison prématuré
RBP :	Protéine de liaison à l'ARN
RER :	Réticulum endoplasmique rugueux
RIP :	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
RIP-CHIP :	Immunoprécipitation d'ARN suivi d'une analyse de micropuces d'ADN
RISC :	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RMN :	Résonance magnétique nucléaire

RNP :	Complexe ribonucléoprotéique
RPA :	<i>Replication Protein A</i>
RT-qPCR :	Transcription inverse – réaction en chaîne par polymérase quantitative
SBS :	Site de liaison de Staufen
SDS-PAGE :	Gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SIRT1 :	Sirtuine 1
SMAC :	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
SMD :	<i>Staufen-mediated decay</i>
SSM :	<i>Staufen-Swapping Motif</i>
Stau :	Staufen
TBD :	Domaine de liaison à la tubuline
TBP :	Protéine de liaison à la boîte TATA
TDP-43 :	<i>TAR DNA-binding Protein 43</i>
TIAR :	<i>TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1</i>
TNF :	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TopBP1 :	<i>Topoisomerase II Binding Protein 1</i>
Topo :	Topoisomérase
TP53INP1 :	<i>Tumor Protein p53-Inducible Nuclear Protein 1</i>
TRAIL :	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
UTR :	Région non-traduite
UV(C) :	Ultraviolet (de type C)
YB-1 :	<i>Y Box Binding Protein 1</i>
YFP :	Protéine fluorescente jaune
YY1 :	Yin Yang 1

À mes parents, pour tout ce qu'ils m'ont donné

Remerciements

Cette thèse comprend une grande partie de moi-même, mais elle est aussi constituée de plusieurs petits morceaux d'autres personnes, sans qui je ne pourrais aujourd'hui envisager la fin de mes études.

D'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Luc DesGroseillers. Merci pour ta patience, ta gentillesse, ta grande disponibilité et ta porte toujours ouverte. Il y a eu des hauts et des bas à travers toutes ces années passées dans ton laboratoire et je te suis reconnaissante pour ton support et ta confiance pendant ce parcours sinueux!

Merci également à mes collègues actuels du laboratoire. Merci à mes deux Français préférés, Rémy Beaujois et Stéphanie Mollet! Je me souviendrai longtemps de nos discussions/niaiseries dans le bureau. Rémy, merci pour ton sens de l'humour et pour avoir « enduré » ma musique et ma propreté excessive à ton arrivée dans le labo! J'ai passé de très bons moments avec toi pendant mes dernières années et ça a été bon pour le moral. Steph, merci pour ton ouverture d'esprit, tu es quelqu'un de très vrai et ça fait du bien de te côtoyer. Un gros merci ensuite à Mehdi Ghram, merci pour toutes nos discussions, on en a abordé des sujets variés! Merci de m'avoir écouté sans jugement et merci pour ta confiance. Je vais m'ennuyer de ces discussions! Merci à Xin Zhang d'avoir repris en main le projet avec un sourire et un enthousiasme contagieux. Sami Hsine et Yulemi Gonzalez, je ne vous ai pas côtoyés longtemps, mais je vous souhaite bonne chance dans la poursuite de vos études.

Je ne voudrais pas passer sous silence l'apport de certains des anciens du labo que j'ai connus et qui ont laissé une trace indélébile. D'abord, un énorme merci à Karine Boulay, qui a été une source d'inspiration pour moi, de par sa détermination et sa passion. Merci Karine d'avoir répondu à pratiquement toutes les questions qui me sont passées par la tête pendant toutes ces années! Merci ensuite à Wildriss Viranaicken, nous n'étions pas faits pour être colocataires, mais je pense qu'on faisait une assez bonne équipe dans le labo! Merci pour ton imagination scientifique débordante et pour m'avoir accordé ta confiance à une étape cruciale de mes études. Merci aux *girls* avec qui j'ai partagé le local à un moment ou à un autre, Maria

Sanchez, Mireille Moreau, Frédérique Badeaux et Céline Fréchina, ça a été un réel plaisir de partager avec vous toutes des discussions sérieuses, des moments de folies, des histoires de filles, etc.! Un merci particulier à Gabriel Lapointe, pour ton support... et pour les *rides* de métro! Merci aussi à Samuel Dugré-Brisson et à Laurent Chatel-Chaix, qui m'ont donné de bons coups de main pendant les premières années de mon doctorat. Merci aussi à un stagiaire-devenu-ami, Bruno Dumais, qui a été le stagiaire que tous les superviseurs de stage veulent avoir!

Merci à des collègues d'autres laboratoires avec qui j'ai partagé de bonnes vieilles conversations de corridor : Xavier Deschênes-Simard, Frédéric Lessard, Geneviève Huot, Alexandra Cadar, Marie-France Gaumont-Leclerc, Étienne Vincent, Jean-François Denis, et tous les autres. Une pensée aussi pour les collègues du laboratoire du Dr. Pascal Chartrand avec qui j'ai eu la chance de partager le bureau à travers les années : Franck Gallardo, Anne-Laure Finoux, Amélie Forget, Faissal Ouenzar, Emilio Cusanelli, Karen Shahbadian et Zhi Fa Shen. Je tiens aussi à remercier Véronique Bourdeau pour sa patience et son aide technique.

Je dois aussi beaucoup à plusieurs employés du Département de biochimie, particulièrement à « l'homme à tout faire du département », Philippe Lampron, qui m'a écouté parler autant de problèmes de qPCR que de correction de rapports de laboratoire! Mais surtout, Philippe, merci pour ton appui à un moment dans ma vie où j'en avais bien le besoin, je t'en serai toujours reconnaissante. Merci à Louise Cournoyer pour ton aide en culture cellulaire... et pour toujours être là pour me rappeler de remplir l'azote! Merci à Monique Vasseur pour l'appui technique avec pratiquement tous les appareils du département! Merci enfin à Sylvie Beauchemin, je pense que tu ne le croiras même pas quand je vais entrer dans ton bureau pour déposer ma thèse!

Un énorme merci aussi à toute la *gang* du laboratoire d'enseignement : Daniel Chevrier, Nathalie Buron, André Racicot, Nicole Berniquez et Shona Teijeiro. J'ai passé des moments très enrichissants parmi vous à donner des « démos »! Même si je trouvais ça toujours trop de bonne heure (!), me retrouver parmi vous (après mon arrivée à la dernière minute, bien sûr!) et les étudiants (en tout cas, la majorité d'entre eux!) me mettait tout de suite de bonne humeur.

Maintenant, un remerciement peut-être un peu incongru, mais je voudrais remercier ceux qui sont cachés dans mon iPod de m'avoir accompagné dans à peu près toutes mes heures de travail. Alors, merci à Hey Rosetta!, Arcade Fire, Karkwa, Half Moon Run, MIKA, Hanson, David Cook, Kris Allen, Coldplay, Dan Mangan, Florence + the Machine, KT Tunstall, Marie-Pierre Arthur, Matt Nathanson, Metric, etc. ainsi que Grant Lawrence et Jian Ghomeshi, pour l'inspiration et une petite dose supplémentaire d'énergie!

Je voudrais aussi remercier ma meilleure amie Stéphanie Awad, qui est toujours là pour moi, dans les bons moments comme dans les moins bons. Merci Steph pour ta générosité et pour les voyages partagés.

Finalement, je voudrais remercier mes parents, Lucie et Jacques. Merci pour votre support, pour votre présence indéfectible et surtout, pour votre amour. J'ai en fait de la difficulté à trouver les mots appropriés pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissante. Pour tout. J'espère d'abord et avant tout que vous soyez fiers de moi pour ce travail accompli!

Introduction

1. Le cancer et le traitement par chimiothérapie

Tous les jours, l'intégrité de notre ADN est soumise à de nombreux assauts. Effectivement, des altérations spontanées peuvent se produire dans l'ADN à la suite, par exemple, de certaines réactions d'hydrolyse dans la cellule, ou encore, à cause d'espèces réactives de l'oxygène produites par le métabolisme. Aussi, des dommages à l'ADN peuvent être causés par des agents environnementaux, comme les rayons UV du soleil ou les produits chimiques dans la cigarette. Au total, il semble que chacune de nos cellules soit soumise à plus de 10^5 lésions à l'ADN par jour (Ciccia and Elledge, 2010; Hoeijmakers, 2009). Bien sûr, toutes ces attaques sur notre ADN peuvent être à l'origine de nombreuses maladies, comme le cancer. En effet, les dommages à l'ADN peuvent causer des mutations ponctuelles, des réarrangements chromosomiques et plus généralement, de l'instabilité génomique, ce qui peut mener vers un dérèglement de la prolifération cellulaire, et donc, vers le cancer.

Toutefois, la possibilité de créer des dommages dans l'ADN permet aussi de traiter ces mêmes cancers. En effet, les cellules peuvent répondre à des lésions dans l'ADN de plusieurs façons, qui seront abordées plus loin, dont l'arrêt de la prolifération et la mort cellulaire. La réponse cellulaire obtenue à la suite d'un traitement avec un agent endommageant l'ADN dicte ainsi l'efficacité de celui-ci pour enrayer le cancer. En fait, les dommages à l'ADN font partie d'un ensemble de traitements possibles contre le cancer qui sont aujourd'hui connus sous le nom général de *chimiothérapie*.

1.1 Historique de la chimiothérapie

La chimiothérapie semble tellement commune aujourd'hui qu'il est difficile d'imaginer que les premiers essais de traitement du cancer par des composés chimiques ont été réalisés seulement dans les années 1940. En 1942, les pharmacologistes Louis Goodman et Alfred Gilman ont réussi à employer du gaz moutarde azoté pour assurer une régression tumorale chez un patient atteint d'un lymphome (Chabner and Roberts, 2005). Quelques années plus

tard, le pathologiste Sydney Farber a été l'initiateur de la synthèse de composés antifolates, comme le méthotrexate, composés qui ont ensuite été utilisés pour traiter des enfants aux prises avec des leucémies lymphoblastiques aiguës (Chabner and Roberts, 2005). Quelques autres drogues ont été découvertes pendant les deux décennies suivantes, mais c'est seulement en 1965 que les traitements combinatoires, c'est-à-dire l'utilisation de combinaisons de drogues ayant des sites d'action divers, ont été instaurés. Ce type de traitement est encore employé aujourd'hui, en raison du développement de résistance aux drogues dans les cellules tumorales.

À un certain point dans les années 1980, la recherche semblait mener à un cul-de-sac, puisqu'il était de plus en plus difficile de trouver des composés ayant des capacités antitumorales supplémentaires par rapport aux drogues déjà découvertes pendant les décennies 50, 60 et 70. En outre, parmi les problèmes majeurs rencontrés, la toxicité aiguë des composés disponibles provoquait de nombreux effets secondaires chez les patients traités, effets allant jusqu'à se manifester après la régression complète de leur tumeur. (Chabner and Roberts, 2005). Alors, dès la fin des années 80, les chercheurs ont porté leurs efforts sur le développement de ce qui est aujourd'hui appelé *thérapies ciblées*, rendues possibles grâce à la connaissance sans cesse grandissante des mécanismes génétiques et moléculaires qui sont en cause dans la progression des cancers. Il existe maintenant différents composés qui agissent spécifiquement sur un aspect précis du développement d'une tumeur. L'utilisation de ces composés en est encore à ses balbutiements, étant donné les grandes différences qui existent entre deux patients, entre deux tumeurs, même lorsqu'elles affectent le même organe. Ainsi, ces molécules sont encore habituellement employées en combinaison avec les drogues originales développées le siècle dernier (Chabner and Roberts, 2005). Un autre aspect primordial de la recherche en cours depuis l'élaboration des premiers composés anticancer porte sur le fonctionnement détaillé des divers traitements employés contre le cancer. Les premières observations montraient seulement si la tumeur régressait ou non à la suite du traitement, mais il est maintenant possible de comprendre davantage comment celui-ci affecte les cellules, normales ou tumorales, au niveau moléculaire.

1.2 Différentes drogues, différents effets

Pour qu'un traitement contre le cancer soit efficace, il doit s'attaquer prioritairement aux cellules tumorales, et non aux cellules normales de l'organisme. De ce fait, la plupart des drogues existantes s'attaquent principalement aux cellules qui sont en prolifération rapide, ce qui est le cas des cellules cancéreuses, mais aussi de certaines autres cellules de différents organes. Celles-ci peuvent proliférer aussi rapidement que les cellules dont on veut réellement se débarrasser, ce qui peut conférer une forte toxicité à la drogue employée.

Parmi les exemples les plus courants de drogues ou de composés utilisés pour vaincre le cancer, on retrouve des anticorps monoclonaux ou d'autres petites molécules reconnaissant et inhibant l'activité de certains récepteurs situés à la surface des cellules, qui sont normalement impliqués dans la reconnaissance de signaux indiquant à la cellule de croître et de se diviser (Espinosa et al., 2003). Une autre classe bien connue, les taxanes, a pour cible la tubuline et les microtubules. Les taxanes stabilisent les microtubules, ce qui empêche leur réorganisation, essentielle pour la mitose et la division cellulaire. Enfin, il existe des oligonucléotides antisens qui peuvent reconnaître et inhiber certains ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans le processus de mort cellulaire, qui est essentiel lorsque le but est de détruire les cellules cancéreuses (Espinosa et al., 2003). Néanmoins, les agents chimiothérapeutiques utilisés le plus couramment encore aujourd'hui s'attaquent à l'intégrité du génome et peuvent causer diverses lésions préférentiellement fatales à l'ADN.

1.2.1 Les dommages à l'ADN comme traitement contre le cancer

Une des formes courantes de traitement contre le cancer, appliqué dans plus de 50% des cas, est la radiothérapie. Elle permet la formation de bris double brin (Fig. 1), qui représente la forme de lésions à l'ADN la plus toxique (Helleday et al., 2008). Si on examine le premier agent chimique qui a été découvert comme ayant des propriétés antitumorales, le gaz moutarde azoté, celui-ci fait partie de la famille des agents alkylants. Ce sont des molécules très réactives, qui peuvent se lier à des bases de l'ADN pour former des adduits volumineux. Certaines de ces molécules peuvent se lier à deux bases de l'ADN et ainsi former

des réticulations entre les deux brins d'ADN. Ceci a comme conséquence d'interférer fortement avec le processus de réplication de l'ADN (Helleday et al., 2008).

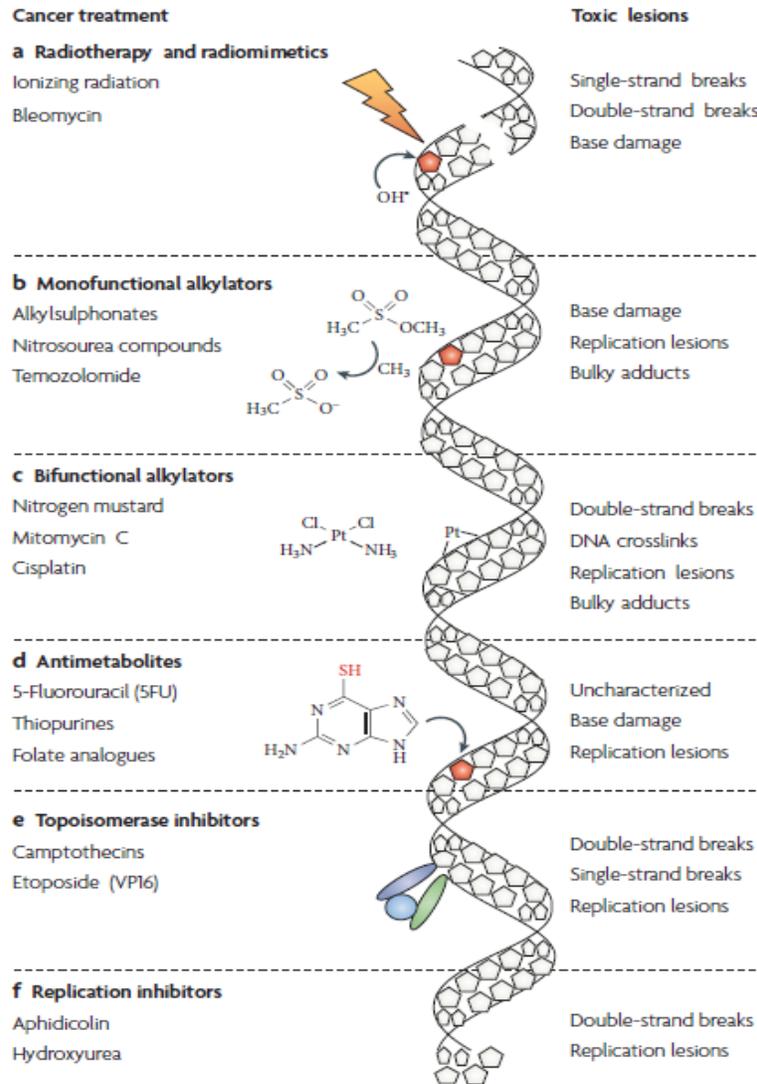


Figure 1. Résumé des types de lésions à l'ADN causées par divers agents chimiothérapeutiques.

Exemples d'agents anticancéreux faisant partie des familles suivantes : a) Radiothérapie et radiomimétiques. b) et c) Agents alkylants. d) Antimétabolites. e) Inhibiteurs des topoisomérases. f) Inhibiteurs de réplication. Les types de lésions engendrées sont décrits dans le texte. Tiré de (Helleday et al., 2008).

Une autre famille de composés chimiothérapeutiques est la famille des antimétabolites, dont fait partie, par exemple, le 5-fluoro-uracil (5FU), très connu pour son utilisation dans le traitement du cancer colorectal. Leur structure ressemble à celle de nucléotides, ou d'intermédiaires dans la synthèse des nucléotides. Ils peuvent agir de deux façons différentes, soit en inhibant la synthèse des nucléotides, soit en étant incorporés dans l'ADN, ce qui encore une fois, intervient dans le processus normal de réplication de l'ADN (Helleday et al., 2008). Une autre façon de directement inhiber la réplication est d'utiliser des drogues comme l'aphidicoline, qui inhibe directement l'activité des polymérase d'ADN impliquées dans la réplication (Fig. 1) (Helleday et al., 2008).

Enfin, il est possible d'intervenir dans l'activité d'autres enzymes impliquées dans divers aspects du métabolisme de l'ADN. En effet, les enzymes topoisomérases (topo) I et II sont nécessaires pour garantir la bonne topologie de l'ADN. Pendant la réplication ou la transcription de l'ADN, des supertours positifs ou négatifs sont introduits dans l'ADN et les topoisomérases sont responsables de défaire ces supertours. Elles le font en clivant un des deux brins de l'ADN et en se liant à cette extrémité de façon temporaire. Des inhibiteurs tels que la doxorubicine ou l'étoposide (topo II) ou la camptothécine (topo I) peuvent s'associer à ces complexes ADN-topo et venir perturber la réplication de l'ADN, ce qui va transformer les bris simple brin faits par les topoisomérases en cassures double brin qui peuvent être fatales pour la cellule (Hsiang et al., 1989; Markovits et al., 1987). Puisque l'inhibiteur de la topoisomérase I camptothécine a un intérêt particulier pour cette étude, nous nous pencherons un peu plus sur son mécanisme d'action.

1.2.2 Les camptothécines, inhibiteurs de la topoisomérase I

La camptothécine (CPT) a d'abord été isolée en 1966 à partir d'un arbre d'origine chinoise, le *Camptotheca acuminata* (Chabner and Roberts, 2005; Pommier, 2006). Cependant, bien que la substance semblait avoir des capacités antitumorales, elle s'est révélée trop insoluble, instable et toxique lors des premiers essais effectués dans les années 1970. Effectivement, pour être active la CPT doit se retrouver dans sa forme lactone, qui est toutefois instable au pH physiologique et est donc convertie dans une forme carboxylate inactive (Fig. 2) (Pommier, 2006). Ce n'est qu'en 1996 qu'un analogue de la CPT, nommé

irinotecan, a été approuvé pour être utilisé dans le traitement du cancer colorectal (Fig. 2) (Chabner and Roberts, 2005). L'irinotecan peut être métabolisé par le corps dans sa forme active, nommée habituellement SN-38. Un autre analogue, le topotecan, a ensuite été approuvé pour traiter des cancers du poumon et des ovaires. L'irinotecan et le topotecan, contrairement à la camptothécine, sont solubles dans l'eau, donc plus faciles à absorber pour le corps humain.

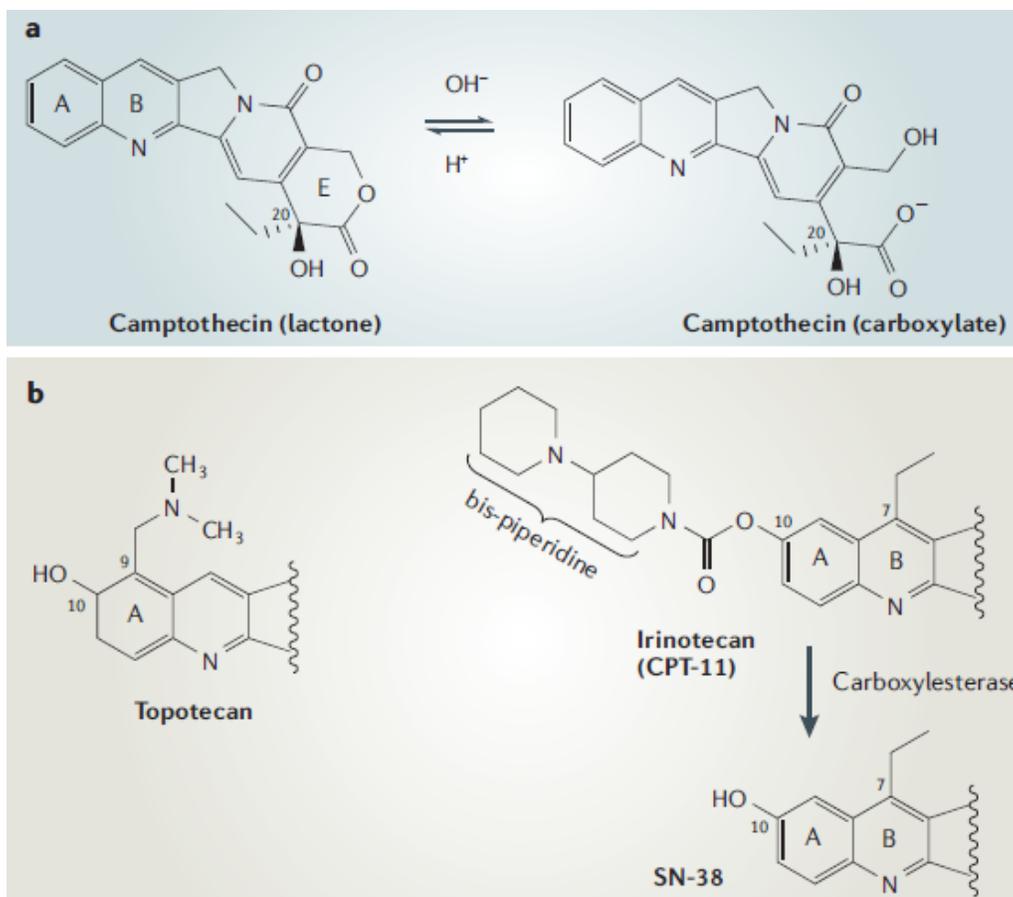


Figure 2. Structures chimiques de la camptothécine et de ses dérivés.

a) Structure de la camptothécine sous sa forme active (lactone) et sous sa forme inactive (carboxylate). b) Structure des deux dérivés actifs de la camptothécine, le topotecan et l'irinotecan, qui peuvent être métabolisés par des carboxylestérases pour donner la forme active, le SN-38. Tiré de (Pommier, 2006).

Ce qui a permis la mise au point de l'irinotecan et du topotecan, c'est la découverte, en 1985, que la cible physiologique de la CPT était la topoisomérase I (Hsiang et al., 1985). Tel que mentionné ci-dessus, topo I accomplit son rôle en clivant un brin d'ADN et en lui permettant de faire une rotation autour de l'autre brin afin de relaxer les supertours dans l'ADN. Lors du clivage, topo I s'associe à l'extrémité 3' libre de l'ADN par un lien phosphotyrosine et permet la religation du brin clivé à la suite de sa rotation. Le complexe ADN clivé-topo I est normalement transitoire, mais la CPT agit en formant un complexe ternaire avec l'ADN et topo I, en s'intercalant entre les paires de bases en amont et en aval du site de clivage. Ceci a pour conséquence de désaligner l'ADN et donc de perturber la religation du brin clivé (Staker et al., 2002).

Étant donné que le complexe ternaire entre l'ADN, topo I et la CPT est réversible, la seule formation de ce complexe n'est pas suffisante pour causer des dommages à l'ADN. En fait, la CPT devient cytotoxique au moment où l'ADN polymérase et ses facteurs associés entrent en collision avec le complexe ternaire dans une fourche de réplication (Fig. 3). Ceci provoque alors une cassure double brin dans l'ADN, cassure qui est dépendante du processus de réplication de la cellule. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur des ADN polymérases, l'aphidicoline, peut annuler l'effet cytotoxique habituel de la CPT, ce qui montre effectivement la dépendance de la CPT sur la réplication normale de l'ADN dans les cellules visées (Hsiang et al., 1989). Plus récemment, il a aussi été montré que la CPT inhibe directement la capacité de topo I à défaire des supertours positifs dans l'ADN, ce qui perturbe ainsi la progression de la fourche de réplication et est donc aussi responsable de la toxicité de la drogue (Koster et al., 2007).

La CPT peut aussi affecter l'efficacité de la transcription des gènes en ARNm, lorsque des complexes formés par l'ARN polymérase et ses facteurs associés entrent en collision avec les complexes ternaires définis précédemment. Il en découle donc que la CPT peut être un inhibiteur de l'étape de l'élongation de la transcription (Collins et al., 2001). Il semble que ce phénomène soit moins important dans l'établissement de la toxicité de la drogue, mais l'inhibition de la transcription par la CPT mène tout de même à la formation de bris simple brin irréversibles dans l'ADN, ce qui conduit possiblement à la formation de cassures double

brin, bien qu'elles se produisent seulement lorsque le complexe ternaire est lié au brin matrice de l'ADN (Wu and Liu, 1997).

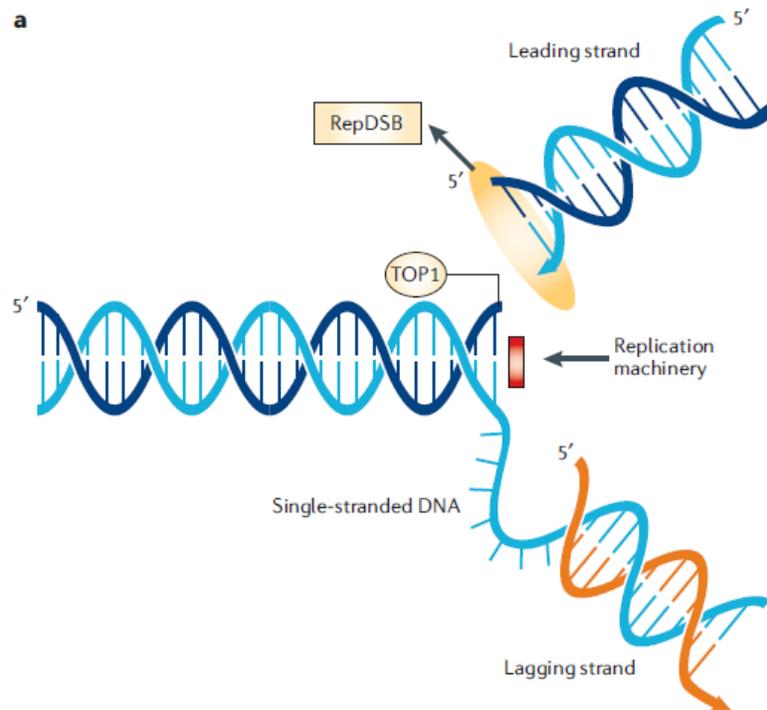


Figure 3. Collision entre la fourche de réplication et le complexe ternaire ADN-topo I-CPT.

Lors de la réplication du brin précoce (*leading strand*), cette collision entraîne la formation de bris double brin dépendants de la réplication de l'ADN, représentés par RepDSB (*Replication-dependent Double-Strand Break*) sur la figure. Tiré de (Pommier, 2006).

Une étude récente démontre que la CPT peut aussi affecter la transcription de certains gènes autrement et toujours indépendamment de son effet sur la réplication de l'ADN. Ainsi, l'expression du gène *HIF-1 α* (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*) diminue lors d'un court traitement à la CPT, ce qui s'explique par le fait que l'ARN polymérase II s'échappe d'un site de pause proximal du promoteur de *HIF-1 α* . Aussi, la CPT favorise la transcription d'un ARN antisens en 5' du gène codant pour HIF-1 α plutôt que l'ARN habituel (Baranello et al., 2010). L'inhibition de la topoisomérase I par la CPT semble donc introduire plusieurs formes de

stress transcriptionnel dans la cellule traitée. Enfin, il est intéressant de noter que la CPT a aussi un effet réversible sur la régulation de l'épissage alternatif de plusieurs gènes, ce qui se fait grâce à l'abolition de l'interaction entre la protéine EWS (*Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1*), un facteur associé à l'ARN polymérase II, et YB-1 (*Y Box Binding Protein 1*), une protéine associée au spliceosome (Dutertre et al., 2010). La conséquence de l'inhibition de l'interaction entre ces deux protéines est le saut de certains exons et la production de protéines inactives. En somme, l'induction de dommages à l'ADN demeure tout de même la conséquence la plus importante de l'utilisation de la CPT et ces dommages engendrent divers types de réponses cellulaires, qui seront détaillées dans le prochain chapitre.

2. La réponse aux dommages à l'ADN

Étant donné que les lésions qui sont faites à l'ADN sont dommageables pour la cellule, celle-ci possède tout un arsenal prêt à réagir à la moindre lésion dans l'ADN. Il s'amorce alors une chaîne de réactions et d'événements que l'on nomme couramment *réponse aux dommages à l'ADN*. Évidemment, si les stress de type génotoxique sont employés, par exemple, dans le traitement contre un cancer, il est essentiel de bien comprendre en quoi consiste cette réponse et de plus en plus, il est possible de l'exploiter afin de favoriser la guérison de patients cancéreux.

Il est intéressant de noter que les cellules dans lesquelles un ou plusieurs oncogènes deviennent activés, à la suite d'une mutation dans les gènes qui les encodent par exemple, vont non seulement enclencher le processus de transformation menant à la formation de lésions potentiellement précancéreuses, mais aussi développer des dommages à l'ADN. Ainsi, ces cellules, qui se trouvent dans les premières étapes de leur évolution vers la malignité, montrent des signes clairs d'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, et ceci leur permet en fait d'établir une barrière anticancéreuse qui les mène idéalement vers l'arrêt de la prolifération cellulaire dérégulée et la mort cellulaire (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN semble se produire tellement tôt dans le processus de transformation qu'elle se produit avant même la mutation ou la perte d'expression de certains gènes répresseurs de tumeur, comme p53 (Bartkova et al., 2005).

Néanmoins, il semble que ce phénomène engendre une pression sur les cellules afin d’outrepasser cette barrière antitumorale, ce qui cause le développement possible de mutations ou de modifications dans les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la réponse aux dommages à l’ADN. Ceci favorise alors l’instabilité génomique et la prolifération non-contrôlée qui sont caractéristiques des cellules cancéreuses (Bartek et al., 2007).

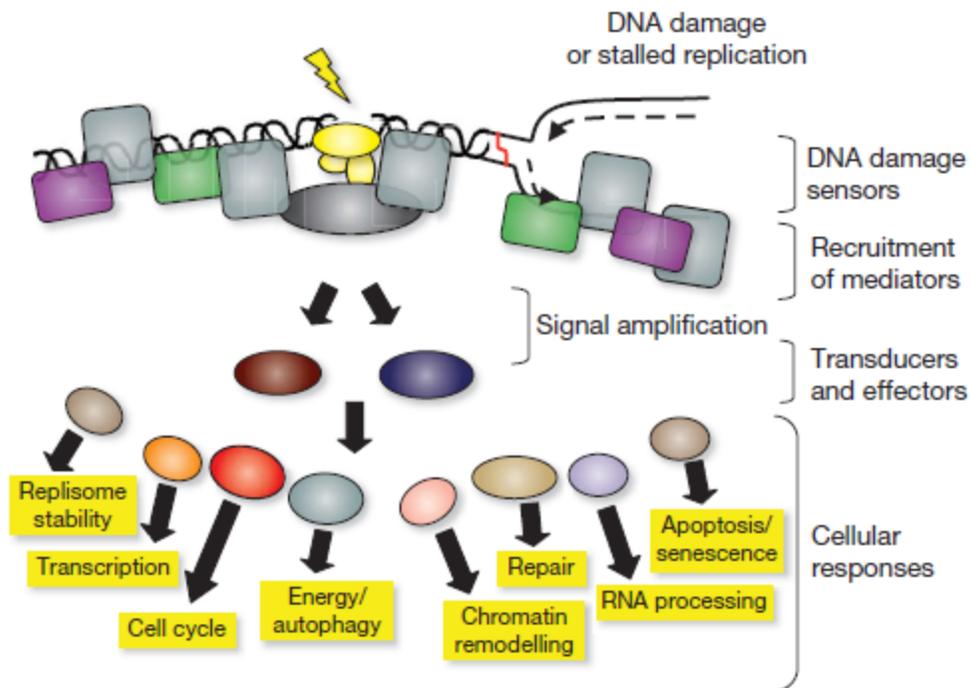


Figure 4. Schéma simplifié de la réponse aux dommages à l’ADN.

Voir description plus complète dans le texte. Tiré de (Jackson and Bartek, 2009).

Peu importe si les lésions à l’ADN se produisent de façon endogène ou à la suite d’effets environnementaux ou d’utilisation de drogues génotoxiques, la réponse qui est engagée par la suite est très complexe et peut mener à différents destins cellulaires. Par souci de clarté, les différentes répliques des cellules aux dommages à l’ADN seront traitées séparément dans les prochaines sections, mais il est important de savoir que ces réponses s’entrecroisent et qu’une cellule enclenche toute une chaîne complexe d’événements qui peut mener à diverses fins. La figure 4 présente un résumé de ce qui se produit lorsque des

dommages à l'ADN se manifestent. Il y a ainsi certaines protéines qui agissent comme senseurs du dommage. Ces protéines peuvent alors recruter des médiateurs qui vont être à l'origine de l'amplification du signal vers différents effecteurs. Ceux-ci sont alors responsables de déclencher la multitude de réponses possibles dans les cellules visées, comme la réparation de l'ADN, l'arrêt de la prolifération cellulaire via l'activation de points de contrôle, la sénescence (arrêt définitif et irréversible de la prolifération cellulaire) et la mort cellulaire par apoptose.

2.1 La réparation de l'ADN

Puisqu'il existe de nombreux types de lésions que l'ADN peut subir, il existe par le fait même de nombreux mécanismes qui permettent de les réparer. Comme ce n'est pas l'objectif ici de faire une revue exhaustive de tous les processus de réparation de l'ADN et de toutes les molécules impliquées, l'accent sera mis sur les aspects qui apparaissent comme étant les plus essentiels et sur des mécanismes communs (pour des revues plus complètes, voir (Ciccia and Elledge, 2010; Helleday et al., 2008)).

2.1.1 Divers mécanismes de réparation

En général, une lésion particulière dans l'ADN va nécessiter l'activation d'une voie bien précise, et les protéines impliquées dans les diverses voies peuvent être très différentes (Fig. 5). Ainsi, l'alkylation de certaines bases peut être directement inversée grâce à l'action d'enzymes alkyltransférases et dioxygénases (comme les enzymes MGMT et ABH). Ces adduits peuvent également être réparés via l'excision d'une base (*base excision repair* ou BER), qui permet d'enlever la base endommagée et de réparer le bris simple brin qui en découle (Helleday et al., 2008). Des adduits plus volumineux, comme ceux causés par les rayons UV sont quant à eux réparés par l'excision de nucléotides (*nucleotide excision repair* ou NER). Ce mécanisme permet l'enlèvement d'une courte séquence simple brin de 24 à 30 nucléotides contenant la lésion (Helleday et al., 2008). Enfin, les bris double brin étant les lésions les plus dommageables à la cellule, les voies permettant leur réparation sont précieuses pour la cellule. Il en existe deux principales, la recombinaison homologue et la ligature des

bouts d'ADN non homologues (NHEJ ou *non-homologous end joining*) (revue dans (Ciccia and Elledge, 2010)). La différence majeure entre le NHEJ et la recombinaison homologue se situe dans le fait que la ligature de bouts d'ADN non homologues implique que des délétions peuvent se produire lorsque deux bouts d'ADN sont reliés ensemble, alors que la recombinaison homologue va permettre la reconstitution parfaite de la séquence originale. La recombinaison homologue ne peut ainsi se produire que pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire, alors que l'ADN a déjà été répliqué et qu'une chromatide sœur peut être utilisée comme matrice pour la réparation de la séquence endommagée, alors que le NHEJ peut se produire à n'importe quel moment du cycle cellulaire (Lord and Ashworth, 2012).

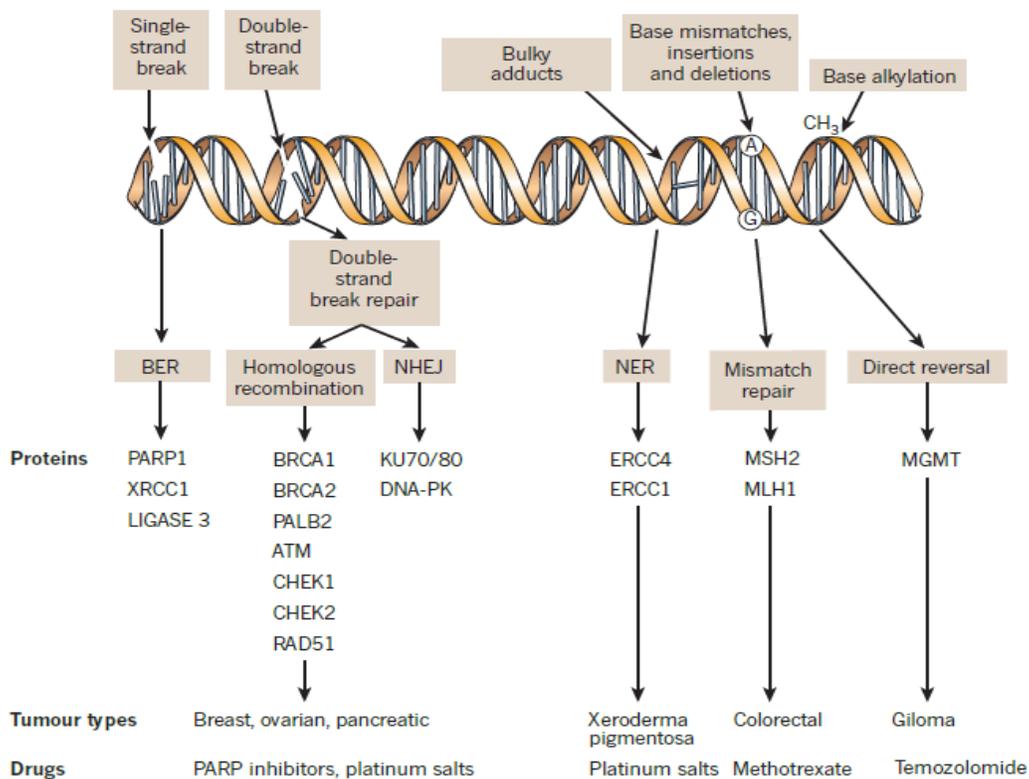


Figure 5. Divers mécanismes de réparation de l'ADN permettent de répondre à différents types de dommages.

Les bris simple brin sont réparés par l'excision de base (BER). Les bris double brin sont réparés par recombinaison homologue ou par ligature de bouts d'ADN non homologues (NHEJ). Les adduits volumineux sont réparés par l'excision de nucléotides (NER). Les mésappariements, les insertions et les délétions sont réparés par *mismatch repair*. L'alkylation

d'une base peut être directement inversée par des enzymes. Tiré de (Lord and Ashworth, 2012).

2.1.2 Voies et molécules impliquées dans la réparation

Comme mentionné ci-dessus, les premiers intervenants dans la réponse aux dommages à l'ADN sont les senseurs du dommage. En fonction du type de dommage, il existe différents types de senseurs. Cependant, des domaines conservés dans ces protéines sont responsables du recrutement des médiateurs majeurs de la réponse aux dommages à l'ADN (Falck et al., 2005). Ces médiateurs obligatoires sont des protéines de la famille des kinases reliées aux phosphoinositide-3 kinases (PIKK) : ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*ATM- and Rad3-related*) et DNA-PKcs (sous-unités catalytiques de la kinase dépendante de l'ADN). Ces kinases sont sans contredit les joueurs les plus importants de toutes les voies qui sont activées lorsque des lésions dans l'ADN se produisent. Leur activation dépend néanmoins de leur recrutement à l'ADN par les protéines senseurs mentionnées plus haut. ATM est donc recrutée par la protéine Nbs1 (qui forme avec Mre11 et Rad50 le complexe MRN), ATR par son coactivateur ATRIP (*ATR-interacting protein*), et DNA-PKcs par Ku80 (qui forme le dimère Ku avec Ku70). Bien qu'ATM, ATR et DNA-PKcs sont activées en réponse à des types de dommages différents (discuté plus loin), leur recrutement se fait de façon semblable par des domaines conservés présents dans la région C-terminale des protéines Nbs1, ATRIP et Ku80, respectivement (Falck et al., 2005) (Fig. 6).

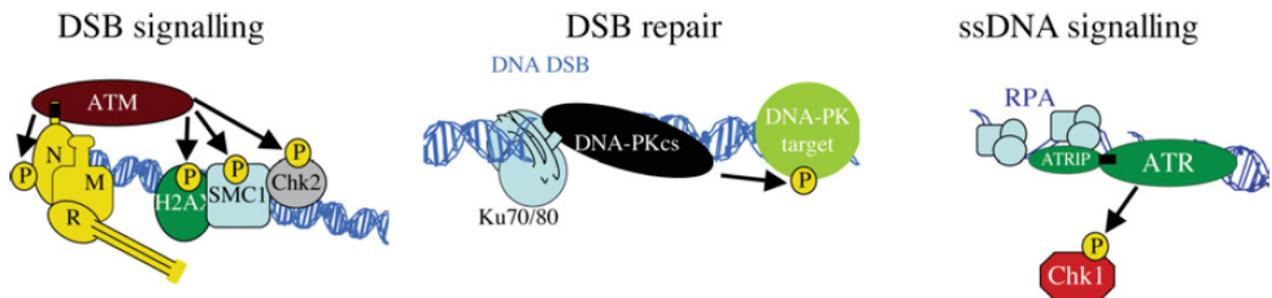


Figure 6. Modèle du recrutement des protéines ATM, DNA-PKcs et ATR sur les sites de dommages à l'ADN.

ATM est recrutée par la protéine Nbs1 (N) du complexe MRN et phosphoryle des cibles impliquées dans la voie de réponse aux bris double brin (DSB). DNA-PKcs est recrutée par le complexe Ku et active la réparation de DSB par NHEJ. ATR est recrutée par ATRIP sur des sites de bris simple brin et est impliquée dans leur réparation. Tiré de (Jackson, 2009).

Chacune de ces kinases possède une pléthore de cibles qui sont impliquées dans tous les aspects de la réponse aux dommages à l'ADN. Certaines de ces cibles sont communes aux trois kinases, mais en général, leurs fonctions en aval du dommage à l'ADN sont plutôt différentes (Jackson, 2009).

La kinase DNA-PKcs, par exemple, est surtout connue pour son rôle dans le NHEJ après la production de cassures double brin. Deux DNA-PKcs étant généralement recrutées sur l'ADN, elles peuvent alors s'autophosphoryler, ce qui protège les extrémités de l'ADN et assure le recrutement du complexe XRCC4/LIG4, qui permet enfin la religation des extrémités double brin (Ciccio and Elledge, 2010; Mahaney et al., 2009). La protéine ATR est quant à elle surtout recrutée sur l'ADN lorsque des séquences simple brin existent dans l'ADN, lorsque des bris simple brin se produisent par exemple, ou encore lorsque des problèmes de réplication se manifestent, comme un blocage d'une fourche de réplication. Les régions simple brin sont d'abord stabilisées par le complexe RPA (*Replication protein A*), puis il y a recrutement de ATR/ATRIP et aussi de protéines nécessaires pour stimuler l'activité kinase de ATR, comme le complexe 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) et TopBP1 (*Topoisomerase II Binding Protein 1*), ce qui permet d'assurer la stabilité de la fourche bloquée et possiblement sa remise en fonction (Ciccio and Elledge, 2010). ATR peut aussi agir comme intermédiaire dans le processus complexe permettant la réparation de bris double brin par recombinaison homologue, qui est habituellement mis en marche par l'activation d'ATM. Effectivement, le complexe MRN peut faire compétition au complexe Ku pour la reconnaissance des cassures double brin, et recrute alors ATM sur le site du dommage. Une des protéines indispensables pour la première étape menant à la recombinaison homologue, la résection des extrémités libres de l'ADN, est BRCA1 (*Breast Cancer 1*), une ubiquitine ligase activée lorsque phosphorylée par ATM (Ciccio and Elledge, 2010).

Il est donc clair que les modifications posttraductionnelles jouent un rôle essentiel dans la réponse rapide aux dommages à l'ADN, non seulement la phosphorylation assurée par les PIKK, mais aussi l'ubiquitination, l'acétylation, la méthylation et la sumoylation. Un des exemples classiques montrant comment toutes ces modifications permettent de coordonner la cascade d'événements se produisant après un stress génotoxique est la phosphorylation très rapide de l'histone H2AX par ATM. En fait, la phosphorylation de H2AX permet surtout d'établir une plateforme sur le site du dommage pour le recrutement des nombreux facteurs impliqués dans le processus, comme BRCA1, ce qui se fait par la liaison directe entre l'histone phosphorylée et la protéine MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (Lou et al., 2006). Cette association qui se forme entre H2AX phosphorylée, ATM et MDC1 est nécessaire pour la propagation de la phosphorylation de H2AX sur une plus grande région de l'ADN, outre la petite région du dommage, et en conséquence, l'amplification du signal initial du dommage (Lou et al., 2006). Au final, ceci permet le recrutement de nombreuses cibles d'ATM ainsi que de protéines impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine, qui sont nécessaires pour assurer l'accès des facteurs de réparation à l'ADN (Fig. 7).

Enfin, un autre type de modification posttraductionnelle assez commune est provoquée par deux protéines de la famille des polymérases poly (ADP-ribose) (PARP), soit PARP1 et PARP2. Ces enzymes peuvent agir autant comme senseur et comme médiateur du dommage, surtout dans le cas de bris simple brin et d'intermédiaires dans la réaction d'excision de base (BER) (Lord and Ashworth, 2012). PARP1/2 s'associe au bris simple brin grâce à des motifs doigts de zinc et produit des chaînes de poly (ADP-ribose) (PAR) qui sont assemblées sur diverses protéines, dont PARP elle-même, certaines histones et d'autres facteurs impliqués dans le BER (Ciccio and Elledge, 2010; Lord and Ashworth, 2012). Plusieurs protéines possèdent des domaines pouvant lier les chaînes PAR, ce qui supporte le recrutement par exemple de complexes qui remodelent la chromatine afin d'assurer l'inhibition de la transcription sur des sites endommagés de l'ADN (Chou et al., 2010).

En définitive, la réponse aux dommages à l'ADN qui vise la réparation de l'ADN est un processus très complexe qui requiert la reconnaissance du dommage par certains facteurs,

l'interaction directe entre plusieurs protéines, l'activation d'enzymes telles que des kinases et des ubiquitines ligases, l'interaction entre des sites phosphorylés, ubiquitinés, PARylés, etc, et encore d'autres facteurs qui vont soit assurer la réparation de l'ADN par différents mécanismes (BER, NHEJ, recombinaison homologue), soit déclencher une signalisation qui va se propager pour affecter plusieurs autres activités cellulaires.

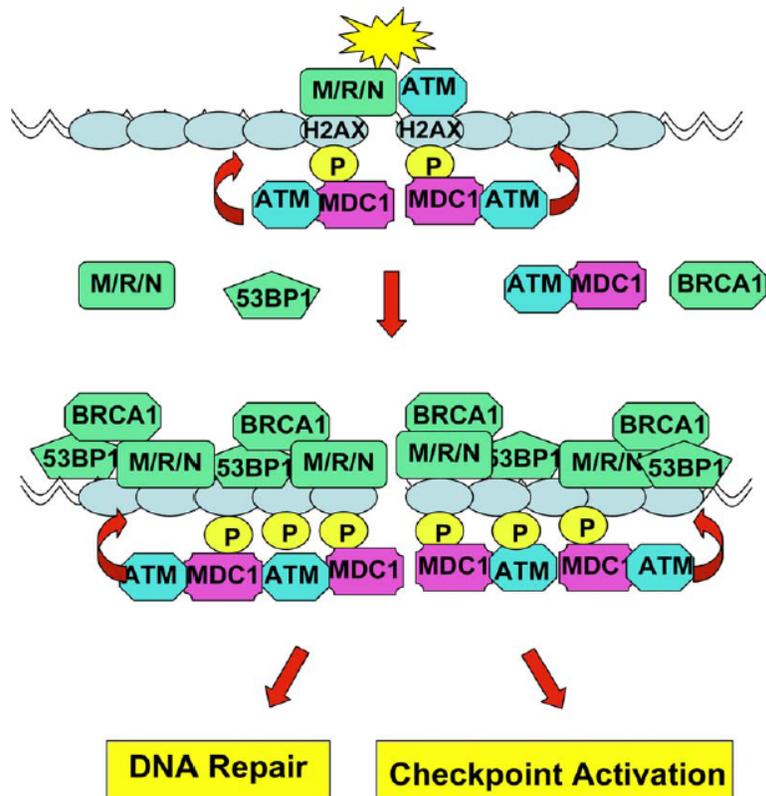


Figure 7. Rôle de la phosphorylation de H2AX et du recrutement de MDC1 dans la propagation du signal initié par ATM sur un site de dommage à l'ADN.

Voir détails dans le texte. Tiré de (Lou et al., 2006).

2.1.3 Exploiter les défauts de la réparation de l'ADN dans les tumeurs

Comme mentionné auparavant, les cellules précancéreuses vont, dans le processus de transformation cellulaire, développer des dommages à l'ADN et activer les voies de réponse à ce dommage. Ceci cause alors une grande pression sur ces voies pour éliminer les méfaits, mais les cellules précancéreuses vont plutôt développer des mutations dans certaines des voies de réparation de l'ADN, ce qui cause encore plus d'instabilité génomique et donc,

l'amplification du dommage à l'ADN. Il est néanmoins encourageant d'observer qu'il est de plus en plus possible d'exploiter des défauts dans la réparation de l'ADN pour traiter le cancer, si bien sûr il est possible de connaître la ou les voie(s) qui est/sont mutée(s) dans les cellules tumorales (Helleday et al., 2008; Jackson, 2009; Lord and Ashworth, 2012). Par conséquent, dans les cellules tumorales où un certain mécanisme de réparation de l'ADN est inhibé, il est possible d'inhiber de façon artificielle un autre mécanisme de réparation qui pourrait agir de façon complémentaire au premier et réparer l'ADN d'une autre façon et donc assurer leur survie. Évidemment, le but du traitement contre le cancer étant d'éviter à tout prix la survie de ces cellules transformées, inhiber les voies de réparation de l'ADN qui fonctionnent toujours dans celles-ci semble une bonne façon de faire. Dans ce cas, les cellules normales peuvent toujours réparer les dommages encourus par le mécanisme de réparation non muté. Ceci peut favoriser une meilleure spécificité et une moindre toxicité des traitements, par rapport aux chimiothérapies habituelles qui affectent toutes les cellules en prolifération rapide, cancéreuses ou non. L'autre avantage est de réduire la résistance des tumeurs à ces mêmes chimiothérapies, la résistance étant causée par la capacité des cellules à réparer les dommages à l'ADN causés volontairement. Inhiber cette capacité des cancers à réparer l'ADN peut donc favoriser une réponse positive au traitement.

Il existe plusieurs exemples d'inhibiteurs de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN qui se sont rendus dans les phases d'études cliniques, mais prenons un seul exemple pour illustrer la situation : les inhibiteurs de PARP1/2. Dans certains cancers, les protéines BRCA1/2 sont déficientes (ces mutations sont en général héréditaires, plutôt qu'acquises pendant la transformation cellulaire). Ces tumeurs sont alors incapables de réparer l'ADN en employant le mécanisme de recombinaison homologue (Moynahan et al., 1999). Il y a quelques années, quelques groupes ont découvert en parallèle que ces tumeurs *BRCA1/2*^{-/-} sont très sensibles à l'inhibition de PARP (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). La figure 8 montre ce qui se produit dans ces tumeurs. Puisque PARP est inhibé, des défauts dans la réparation des bris d'ADN simple brin se produisent, et ceux-ci sont transformés en bris double brin pendant la réplication de l'ADN. Dans les cellules normales, ces bris sont réparés de façon sécuritaire par recombinaison homologue, mais comme le processus est déficient dans les tumeurs *BRCA1/2*^{-/-}, il n'y a pas de réparation, ce qui mène donc les cellules à mettre

en marche d'autres voies afin de ne pas propager leur ADN endommagé, c'est-à-dire l'arrêt de la prolifération et la mort cellulaire. L'inhibition de composants nécessaires pour certaines voies de réparation de l'ADN semble donc une avenue prometteuse pour le traitement du cancer, bien que ça implique une connaissance détaillée des mécanismes qui sont fonctionnels et ceux qui sont déficients dans chaque tumeur individuelle.

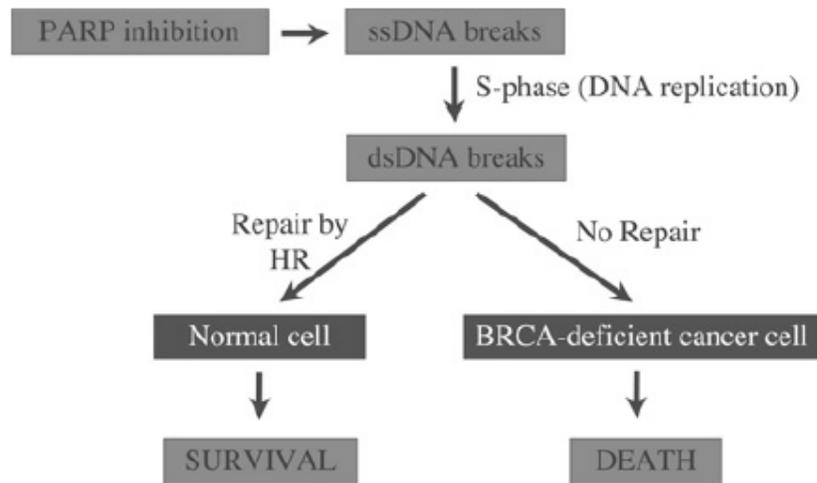


Figure 8. L'effet de l'inhibition de PARP dans des cellules normales par rapport à des cellules cancéreuses déficientes en BRCA.

La réparation des bris double brin dans les cellules normales peut toujours se faire par recombinaison homologue (HR), ce qui garantit leur survie, alors que les dommages ne sont pas réparés dans les cellules cancéreuses. Tiré de (Jackson, 2009).

2.2 L'inhibition de la prolifération cellulaire par l'activation de points de contrôle

La présence de dommages dans l'ADN est délétère pour une cellule surtout lorsqu'arrive le moment de sa division en deux cellules-filles. Par conséquent, la cellule qui subit des lésions dans son ADN doit absolument réparer son ADN avant de se diviser, ou alors, éviter de se diviser. Étant donné la complexité des voies impliquées dans la réponse aux dommages, la cellule doit ralentir ou arrêter son cycle de division cellulaire et ceci implique l'activation de points de contrôle par la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN.

2.2.1 Le cycle cellulaire

Le cycle de division d'une cellule est divisé en deux grandes étapes : l'interphase, pendant laquelle la cellule est en pleine croissance et dédouble tout son ADN, et la mitose, pendant laquelle la cellule se divise pour donner deux cellules-filles ayant le même contenu génétique. L'interphase se divise elle-même en trois grandes phases : G_1 , S et G_2 , alors que la mitose (M) se subdivise en un nombre encore plus grand de stades : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse. Chacune de ces étapes est très importante et joue un rôle important pour la division adéquate de la cellule. Il faut toutefois noter que la majorité des cellules des tissus humains sont en situation de quiescence, que l'on nomme aussi la phase G_0 , et ne sont pas soumises à des cycles répétés de division cellulaire, ce qui n'est évidemment pas le cas pour les cellules tumorales (Malumbres and Barbacid, 2001).

Tout ce qui se produit pendant l'interphase constitue en fait la préparation pour la division cellulaire lors de la mitose. Ainsi, la phase G_1 est l'étape pendant laquelle la cellule augmente sa taille afin d'être en mesure de se diviser et se prépare à la réplication de son ADN, ce qui se produit pendant la phase S. Enfin, la phase G_2 permet à la cellule de vérifier l'intégrité de son ADN dédoublé et de commencer à se préparer à la division cellulaire en initiant la condensation de ses chromosomes. La mitose débute alors par la prophase, pendant laquelle, les chromosomes homologues dupliqués sont définitivement condensés en chromatides sœurs et l'enveloppe nucléaire est fragmentée. Aussi, pendant la prophase et se poursuivant pendant la prométaphase, le fuseau mitotique est formé, constitué de microtubules associés aux centromères et présents à des pôles opposés de la cellule. Les chromatides sœurs sont alors associées au fuseau via le kinétochore et sont disposées à distance égale de chacun des deux pôles de la cellule; c'est la métaphase. Se produit alors l'anaphase, qui permet la séparation des chromatides sœurs et leur migration vers les pôles opposés. La télophase s'ensuit alors que l'enveloppe nucléaire commence à se reformer autour de chacune des paires de chromosomes homologues. Finalement, les deux cellules-filles sont formées par cytokinèse.

La régulation du passage d'une phase du cycle cellulaire à une autre se fait grâce à la formation d'hétérodimères entre des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (Cdk). Il existe plusieurs protéines qui font partie de ces deux familles et plusieurs dimères différents peuvent se former tout au long du cycle cellulaire, surtout en ce qui concerne les cellules de mammifères (Fig. 9) (pour revue voir (Malumbres and Barbacid, 2009)). La bonne séquence d'activation des complexes Cdk-cyclines est essentielle afin d'assurer le déroulement ordonné de toutes les étapes du cycle et aussi, l'irréversibilité de certaines étapes, comme l'entrée des cellules dans la phase S. La régulation des complexes Cdk-cyclines peut se faire de diverses façons : la transcription différentielle des cyclines en fonction de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule, leur dégradation finement régulée par le système ubiquitine-protéasome, la localisation cellulaire des cyclines, la liaison d'inhibiteurs de Cdk sur les hétérodimères et le degré de phosphorylation des kinases Cdk elles-mêmes (Bloom and Cross, 2007).

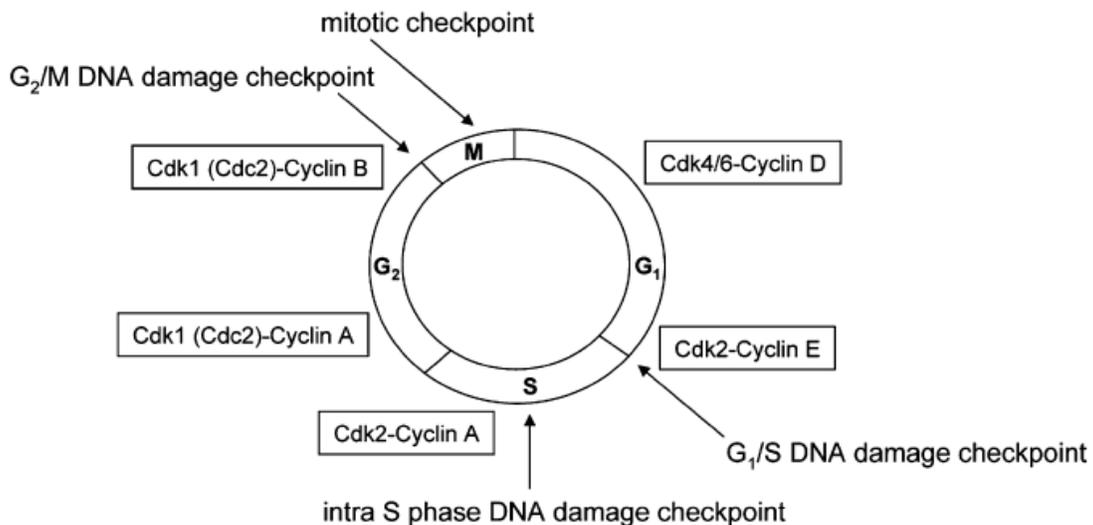


Figure 9. Le cycle cellulaire, les complexes Cdk-cyclines impliqués et les points de contrôle reliés au dommage à l'ADN.

Tiré de (Poehlmann and Roessner, 2010).

2.2.2 Le contrôle par modifications posttraductionnelles : Chk1/2 et Cdc25

Une des familles de protéines impliquées dans le contrôle du niveau de phosphorylation des Cdk est la famille des protéines Cdc25 (*cell division cycle 25*) (Boutros et al., 2007). Il existe trois isoformes membres de cette famille : Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C. Ce sont des phosphatases dont la fonction est nécessaire pour permettre l'activation des Cdk et pour garantir la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire. Les trois phosphatases semblent capables d'activer les complexes Cdk2-cycline E et Cdk2-cycline A, permettant le passage de la phase G₁ à la phase S, et le complexe Cdk1-cycline B, responsable de la transition entre G₂ et la mitose, bien que Cdc25A soit préférentiellement efficace lors de la transition G₁-S, alors que Cdc25B et Cdc25C soient plutôt responsables de la transition G₂-M (Boutros et al., 2007).

Étant donné leur rôle dans les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire, les phosphatases Cdc25 sont des cibles idéales pour les voies de réponse aux dommages à l'ADN afin d'aller causer des délais ou des arrêts dans le cycle, ce qui correspond donc aux points de contrôle liés au dommage à l'ADN. Comme le montre la figure 9, il existe trois points de contrôle qui peuvent être instaurés lors de stress génotoxique : le point de contrôle G₁-S, le point de contrôle intra-S et le point de contrôle G₂-M (Kastan and Bartek, 2004; Poehlmann and Roessner, 2010). Il existe deux protéines kinases qui sont majoritairement responsables de l'activation de ces points de contrôle, Chk1 et Chk2 (*checkpoint kinase 1/2*), qui sont activées par ATM et ATR, Chk1 étant surtout phosphorylée par ATR, et Chk2, par ATM (Zhou and Bartek, 2004).

Les protéines Cdc25 font donc partie des nombreuses cibles directes de Chk1/2. Ainsi, Chk1 peut phosphoryler Cdc25A, ce qui contribue à la formation d'un site de reconnaissance pour l'ubiquitine ligase SCF^{β-TRCP} et donc à la dégradation de la phosphatase par le protéasome (Jin et al., 2003). Ce processus se produit de façon habituelle dans les cellules en absence de dommages, mais est exacerbé lorsqu'un stress génotoxique est imposé aux cellules, via l'hyperphosphorylation de Cdc25A (Jin et al., 2003; Sorensen et al., 2003). Ceci empêche donc Cdc25A de déphosphoryler Cdk1/2, ce qui cause un arrêt en phase G₁ ou G₂ et un ralentissement de la phase S. L'arrêt n'est pas possible en phase S, mais la dégradation de

Cdc25A empêche tout de même l'initiation de la réplication à des origines qui ne l'ont pas encore initiée, ce qui se fait en empêchant le chargement de la protéine Cdc45 sur ces origines (Falck et al., 2002). Cdc45, dépendamment de l'activité de Cdk2, est normalement responsable du recrutement de la polymérase d'ADN et donc, comme Cdc25A est dégradée et ne peut activer Cdk2, il y a un délai qui est créé pendant la phase S. C'est donc le point de contrôle intra-phase S.

Chk1/2 peuvent aussi phosphoryler Cdc25C sur la sérine 216, ce qui va empêcher l'activation du complexe Cdk1-cycline B par déphosphorylation de Cdk1. La phosphorylation de Cdc25C entraîne sa liaison par la protéine régulatrice 14-3-3 et sa séquestration subséquente dans le cytoplasme (Matsuoka et al., 1998; Peng et al., 1997; Poehlmann and Roessner, 2010). Ces événements vont causer un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂, tout juste avant l'entrée en mitose. Inversement, Chk1 phosphoryle également la kinase Wee1 et cette fois-ci, la phosphorylation active l'enzyme, qui peut alors phosphoryler Cdk1 sur un autre site et renforcer son inhibition (Raleigh and O'Connell, 2000). Il semble ainsi que l'inhibition de Cdc25C et l'activation de Wee1 par Chk1/2 soient toutes deux nécessaires pour prévenir la transition entre G₂ et la mitose (Raleigh and O'Connell, 2000).

Une autre famille de kinases est impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, bien qu'elle ne se limite pas à cette fonction. Effectivement, ATM /ATR peuvent activer des kinases activées par les mitogènes suivant divers types de stress génotoxique, surtout les kinases de la voies p38MAPK/MAPKAP Kinase 2 (MK2), spécialement lorsque p53 est inactivé dans les cellules examinées (Reinhardt et al., 2007). De cette façon, un traitement à la doxorubicine de cellules déficientes en p53 engendre un arrêt de leur prolifération à la transition G₂/M, ce qui dépend de la capacité de MK2 à phosphoryler Cdc25B et donc à séquestrer dans le cytoplasme en présence de 14-3-3 (Reinhardt et al., 2007). De même, des cellules déficientes en p53 qui sont traitées avec la cisplatine dépendent de MK2 pour assurer la dégradation de Cdc25A et la formation du point de contrôle G₁/S. Il semble donc que Cdc25A pourrait être une cible directe de MK2, en plus de Chk1 (Reinhardt et al., 2007).

2.2.3 Le contrôle par activité transcriptionnelle : p53 et p21

Bien que le contrôle de la progression à travers le cycle cellulaire qui se fait par la régulation de la phosphorylation/déphosphorylation de diverses cibles impliquées dans le passage d'une phase du cycle à une autre constitue une réponse importante et rapide au stress génotoxique, le contrôle de l'expression de certaines protéines via l'activation ou la répression de la transcription permet une réponse plus soutenue et durable dans le temps (Kastan and Bartek, 2004).

Le régulateur majeur de ce type de réponse aux dommages à l'ADN est le facteur de transcription p53, qui peut être phosphorylé autant par ATM/ATR, DNA-PK et Chk1/Chk2 (Poehlmann and Roessner, 2010). En absence de stress, p53 interagit avec la protéine Mdm2, une ubiquitine ligase responsable d'initier la dégradation de p53. Cependant, la phosphorylation de p53 sur certains résidus par les kinases mentionnées ci-dessus permet de réduire l'interaction entre les deux protéines (Shieh et al., 1997). Également, Mdm2 elle-même peut être phosphorylée par les kinases activées par les dommages à l'ADN, ce qui l'empêche d'autant plus de jouer son rôle de régulateur négatif sur p53 (Maya et al., 2001). p53 devient ainsi plus abondante dans les cellules soumises à un stress génotoxique et son rôle dans l'activation de la transcription est promu.

Une des cibles de p53 essentielle pour assurer l'instauration de points de contrôle du cycle cellulaire est p21^{WAF1}. Cette protéine est un inhibiteur des Cdk, surtout des kinases responsables de la transition entre G₁ et S (Harper et al., 1993). Les kinases Cdk2/4/6 ne peuvent donc pas phosphoryler la protéine du rétinoblastome (pRb), qui est un régulateur indispensable de la croissance cellulaire et un suppresseur de tumeur important. En effet, pRb peut s'associer avec des facteurs de transcription de la famille E2F, ce qui les empêche d'accomplir leur rôle dans la régulation transcriptionnelle de diverses cibles impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Puisque c'est le niveau de phosphorylation de pRB qui dicte si E2F lui est associé ou non, son maintien dans un état hypophosphorylé lors de l'inhibition des Cdk par p21 fait en sorte d'arrêter le cycle cellulaire avant la réplication de l'ADN (Kastan and Bartek, 2004; Poehlmann and Roessner, 2010). p53 peut aussi contrôler la transition entre la phase G₂ et la mitose, ce qui se fait par l'activation transcriptionnelle de p21 et son

inhibition de Cdk1 (Taylor and Stark, 2001). Il est intéressant de noter que p53 peut aussi agir comme répresseur transcriptionnel, et que lors du point de contrôle G₂-M, p53 peut réprimer l'expression du gène codant pour la cycline B1, cycline qui s'associe habituellement avec Cdk1 lors de la progression vers la mitose (Taylor and Stark, 2001). De plus, p53 peut lier directement le promoteur de *CDC25C* et agir comme répresseur de son expression, ce qui va aussi favoriser un arrêt du cycle cellulaire avant l'avènement de la mitose (St Clair et al., 2004). Somme toute, la régulation du cycle cellulaire qui se fait à la suite d'un stress génotoxique peut se faire autant par des mécanismes de modifications posttraductionnelles que par le contrôle de la transcription de certains gènes, et l'expression de plusieurs protéines peut être affectée par les deux processus.

2.3 La sénescence

Il est non seulement possible pour les cellules d'arrêter leur prolifération cellulaire de façon transitoire, mais elles peuvent aussi le faire de façon permanente, et c'est ce qu'on appelle alors la sénescence cellulaire. Le terme sénescence fait en général référence au vieillissement d'un organisme, mais les cellules peuvent elles-mêmes arrêter de proliférer au terme de plusieurs divisions cellulaires successives. Cette sénescence répllicative se produit habituellement en raison du raccourcissement des télomères, structures qui se trouvent aux extrémités des chromosomes et qui assurent leur protection, pendant la réplication de l'ADN au fil de nombreuses divisions cellulaires (pour revue, voir (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)). La sénescence qui se produit en réponse à des dommages à l'ADN est souvent désignée comme étant une sénescence prématurée ou accélérée, puisqu'elle ne survient pas à cause du vieillissement d'une cellule, mais le processus de mise en place de l'état sénescence est très semblable dans les deux cas (Gewirtz et al., 2008).

En fait, lorsque la taille des télomères est presque complètement réduite, les cellules vont reconnaître les extrémités des chromosomes comme étant des bris double brin et lancer toute la cascade de signalisation que constitue la réponse aux dommages à l'ADN et c'est évidemment aussi ce qui se produit lorsque les cellules sont soumises à un stress génotoxique exogène (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Gewirtz et al., 2008). Tout comme pour

l'instauration des points de contrôle du cycle cellulaire, l'arrêt de la prolifération cellulaire menant à la sénescence a besoin de l'activation de la fonction de régulateur transcriptionnel de p53 et de l'expression de p21, qui peut alors inhiber les kinases Cdk et garder pRB dans un état activé et les facteurs E2F dans un état inactif. Ainsi, le traitement de cellules de la lignée HCT116 (cancer colorectal) avec une faible dose de CPT, par exemple, entraîne la sénescence de ces cellules, sauf lorsque l'expression de p53 ou de p21 est abolie. Dans ce cas, c'est la mort cellulaire des cellules HCT116 p53^{-/-} ou p21^{-/-} qui est observée, ce qui montre la dépendance de la réponse sénescence sur l'activité de p21 (Han et al., 2002). De nombreuses autres études montrent que la sénescence est une réponse courante de différents types de cellules à divers traitements anticancer (Gewirtz et al., 2008).

La principale caractéristique des cellules sénescences est donc leur incapacité à proliférer, même après une mise en contact avec des facteurs de croissance, contrairement à des cellules qui sont seulement quiescentes ou dont la prolifération est inhibée de façon provisoire. La plupart des cellules d'un organisme sont en fait quiescentes et ne se divisent donc pas (c'est ce que l'on nomme alors phase G₀ du cycle cellulaire), mais elles peuvent rapidement répondre à des stimuli pour assurer leur retour dans le cycle de division cellulaire. Toutefois, tout comme les cellules quiescentes, les cellules sénescences sont actives au niveau de leur métabolisme et peuvent demeurer vivantes longtemps après leur entrée dans cet état (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Les cellules sénescences peuvent aussi exprimer des gènes qui ne le sont en général pas dans des cellules normales, ce qui permet donc d'avoir certains marqueurs pour identifier les cellules sénescences, comme p53 et p21, mais aussi d'autres marqueurs comme la β-galactosidase associée à la sénescence (Dimri et al., 1995).

Évidemment, p53 et p21 sont exprimés aussi dans des cellules dont la progression dans le cycle cellulaire n'est arrêtée que de façon momentanée, alors il n'est pas évident de déterminer ce qui pousse les cellules à cesser complètement de proliférer et à entrer en sénescence. Une hypothèse réside possiblement dans la capacité de la cellule stressée à réparer son ADN endommagé pendant l'arrêt temporaire du cycle cellulaire. Si le dommage persiste malgré tout, il est probable que la cellule doive alors entrer en sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Il semble cependant que cet état dépende aussi de l'expression

d'autres protéines, comme p16, qui, tout comme p21, est un inhibiteur des Cdk, mais n'est pas exprimé lors d'un arrêt transitoire de la prolifération en réponse aux dommages à l'ADN (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Gordon and Nelson, 2012).

Puisque l'entrée en sénescence des cellules constitue un mécanisme durable de l'arrêt de la prolifération cellulaire, cette réponse pourrait être considérée comme souhaitable à la suite d'un traitement de cellules tumorales avec une drogue causant des lésions dans l'ADN, et cette réponse se produit en effet souvent dans les cellules traitées, tel que discuté ci-dessus (Gewirtz et al., 2008; Han et al., 2002). Néanmoins, des évidences montrent que ce n'est pas toujours une réponse optimale. D'un côté, il faut noter que la réponse permettant aux cellules de devenir sénescents dépend dans presque tous les cas de la présence de p53, mais il est bien connu que pratiquement la moitié des cancers ne permettent pas l'expression de ce « gardien du génome ». Par conséquent, une étude a montré que la réactivation de l'expression de p53 dans une tumeur d'une souris modèle permet une régression majeure de cette tumeur, et que les cellules touchées répondent surtout en mettant en place un état sénescents, plutôt que la mort cellulaire programmée par apoptose (aussi régulée par p53, voir plus loin) (Xue et al., 2007). Primordialement, cette étude a montré que l'organisme peut se débarrasser des cellules tumorales sénescents, et non pas des cellules tumorales non sénescents, à l'aide d'une réponse du système immunitaire (Xue et al., 2007). Dans ce cas, la sénescence semble donc correspondre à une réponse désirée pour assurer la régression du cancer.

D'un autre côté, des cellules sénescents dont l'organisme ne se débarrasse pas peuvent avoir des conséquences dommageables dans le traitement contre le cancer, et surtout peuvent être responsables de la réapparition de la maladie. Plusieurs études ont ainsi montré que des cellules sénescents peuvent échapper à cet état et se remettre à proliférer, lors de la suppression de l'expression de p53 par exemple, ce qui est un événement courant pendant la tumorigenèse (Gordon and Nelson, 2012). Ceci pourrait donc mener à la résurgence de la tumeur, et surtout à une plus grande résistance des cellules « réveillées » face à divers traitements génotoxiques (Gordon and Nelson, 2012). De plus, les cellules sénescents peuvent sécréter de nombreuses protéines dans leur environnement, ce qui se définit alors par l'expression *phénotype sécrétoire associé à la sénescence* (Collado and Serrano, 2010). Ces

cellules peuvent entre autres exprimer les interleukines IL-6 et IL-8 en réponse à la chimiothérapie, ce qui stimule la croissance d'autres cellules cancéreuses dans leur environnement, et même de cellules qui n'ont pas encore atteint la pleine malignité (Coppe et al., 2008). Conséquemment, l'activation de la sénescence cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN dans le cadre du traitement contre le cancer ne correspond pas nécessairement à la réponse idéale souhaitée pour assurer l'efficacité du traitement.

3. La mort cellulaire programmée

La plupart des stimuli qui causent des stress cellulaires, dont la présence de dommages irréparables à l'ADN, peuvent engendrer la mort d'une cellule affectée. Dans le cas de cellules cancéreuses, l'objectif de la grande majorité des divers types de traitements employés est en effet de provoquer la mort de celles-ci. Différentes formes de mort cellulaire programmée, donc qui ne se produit pas par accident ou de façon incontrôlée, peuvent être activées en fonction du type cellulaire et du degré de stress auquel la cellule est soumise. La forme la mieux caractérisée est l'apoptose.

3.1 L'apoptose

Ce type de mort cellulaire a d'abord été identifié en fonction de ses caractéristiques morphologiques très particulières dans les années 1970. Ces caractéristiques incluent le bourgeonnement de la membrane cellulaire et la formation de corps apoptotiques, le rétrécissement de la taille cellulaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Jin and El-Deiry, 2005; Kerr et al., 1972). L'apoptose se produit grâce à l'activation d'une famille unique de protéases, les caspases, qui sont responsables de presque tous les changements morphologiques se produisant dans les cellules en train de mourir. L'apoptose est complétée lorsque des cellules environnantes, dont des macrophages, englobent les corps apoptotiques et le reste de la cellule mourante par phagocytose, ce qui permet d'éviter la mise en place d'une réponse inflammatoire dans l'environnement de cette dernière (Jin and El-Deiry, 2005). Les caspases peuvent être activées par deux voies distinctes, mais non mutuellement exclusives, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

3.1.1 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose est essentiellement dépendante de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et elle se produit généralement en réponse à plusieurs stimuli, dont les dommages à l'ADN causés par la chimiothérapie, comme le montre la figure 10 (Plati et al., 2011). La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie cause non seulement des problèmes dans les voies de respiration de la cellule, mais assure aussi la libération dans le cytoplasme de quelques molécules proapoptotiques, la plus importante étant le cytochrome c. Ceci mène alors à l'activation des caspases grâce à la formation d'un complexe cytoplasmique, l'apoptosome, entre la protéine APAF1 (*apoptosis protease-activating factor 1*), le cytochrome c et certaines caspases (Jin and El-Deiry, 2005). Tout ce processus est régulé de façon très rigoureuse par une famille de protéines qui agit en tant que commutateur assurant la décision entre la survie et la mort cellulaire, la famille Bcl-2.

3.1.1.1 Les protéines de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 est constituée de membres proapoptotiques et de membres antiapoptotiques (pour revue consulter (Chipuk et al., 2010)). Les protéines de cette famille ont en commun un ou plusieurs domaines d'homologie à Bcl-2 (BH). Les membres antiapoptotiques (ex. : Bcl-2, Bcl-xl, Mcl1, Bcl-w, A1) possèdent quatre copies de ce domaine (BH1 à BH4) (Fig. 11). Les protéines proapoptotiques sont elles-mêmes divisées en deux groupes : celles qui possèdent quatre domaines BH (ex. : Bax, Bak), comme les membres antiapoptotiques, et celles qui ne contiennent qu'un seul domaine BH, le BH3 (ex. : Bid, Bim, Bad, Bmf, Bik, Hrk, Puma, Noxa).

Les protéines BH3 sont en général les premières interpellées lorsqu'un stimulus proapoptotique se produit dans la cellule. Il existe plusieurs protéines BH3 différentes puisque ce sont des membres différents de la famille qui vont être activés en fonction du type cellulaire visé et du type de stress. Par exemple, puisque Puma et Noxa sont tous les deux des cibles directes de p53, leur transcription sera particulièrement favorisée dans des situations où la cellule est affectée par des dommages à l'ADN (Strasser et al., 2011). L'activation des protéines BH3 peut aussi se faire de façons diverses. Pour certaines, ce sera leur niveau de

transcription qui sera affecté, comme pour Puma et Noxa, alors que d'autres subissent des modifications posttraductionnelles activatrices, comme la phosphorylation dans le cas de Bad et de Bim, ou un clivage protéolytique, comme Bid (Plati et al., 2011).

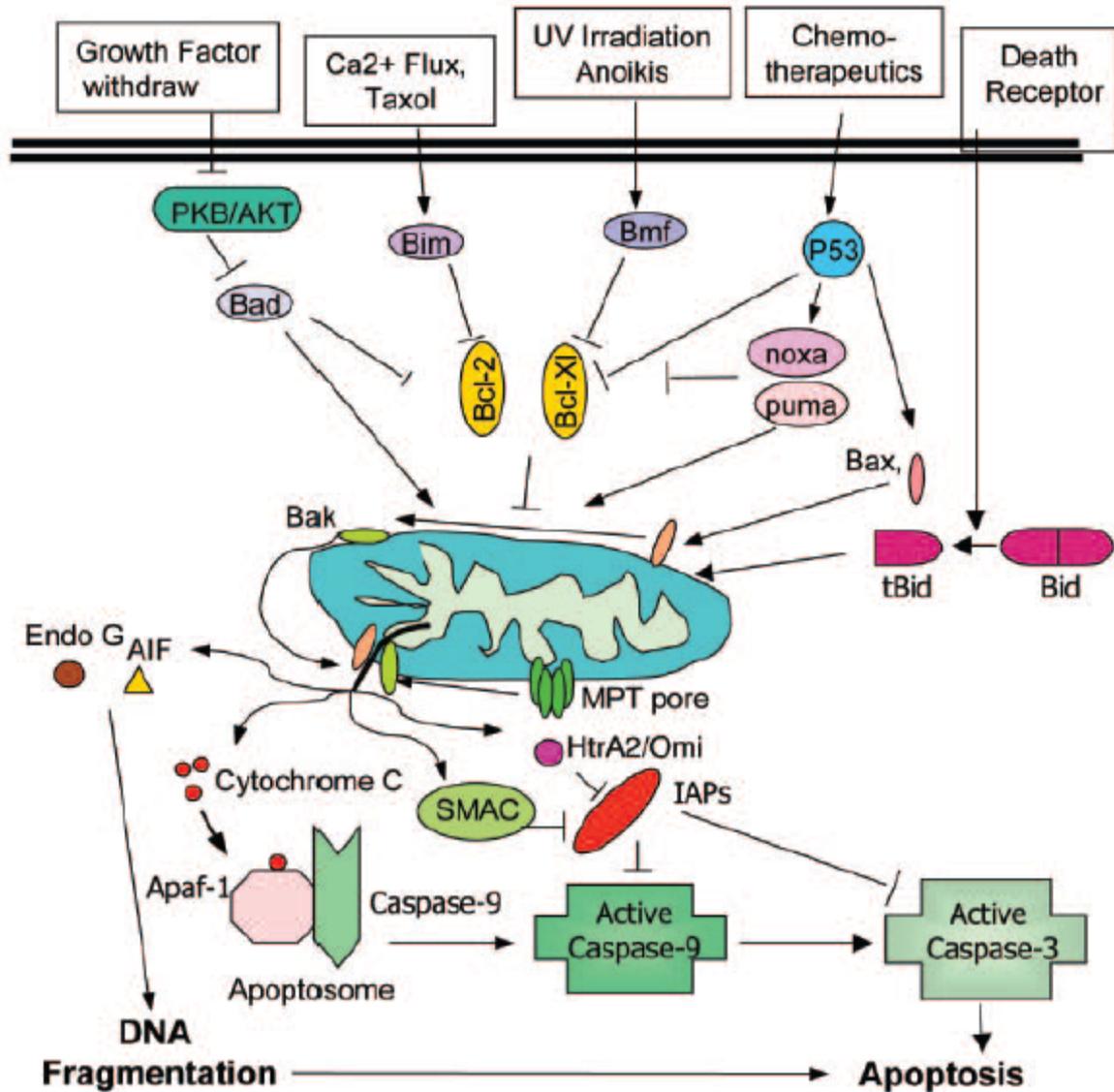


Figure 10. Schéma simplifié de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Cette voie est initiée par divers types de stimuli de stress qui permettent l'activation des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 et l'inhibition de ses membres antiapoptotiques. Ceci mène alors à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, à la libération du cytochrome c et à la formation de l'apoptosome qui permet l'activation des

caspases. D'autres molécules proapoptotiques sont aussi libérées de la mitochondrie, comme SMAC et HtrA2, ainsi que endoG et AIF (voir texte principal pour plus de détails). Tiré de (Jin and El-Deiry, 2005).

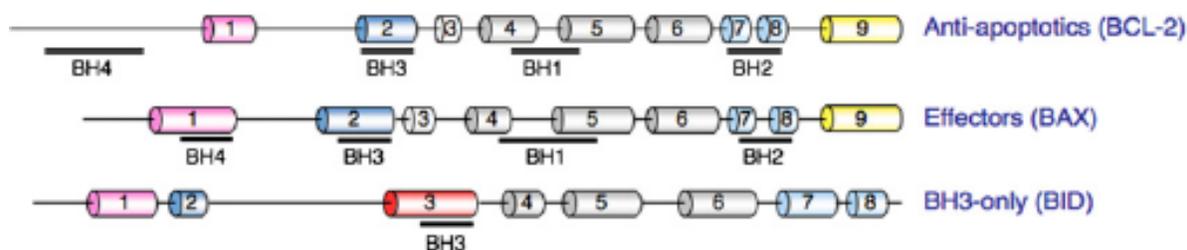


Figure 11. Structures de différentes protéines membres de la famille Bcl-2.

Les protéines antiapoptotiques, comme Bcl-2, possèdent quatre domaines BH, tout comme les protéines proapoptotiques multidomaines, ou effecteurs, comme Bax, alors que les autres membres proapoptotiques de la famille ne possèdent que le domaine BH3, comme Bid. Tiré de (Chipuk et al., 2010)

L'activation des protéines BH3 n'est cependant pas suffisante pour promouvoir l'apoptose. Leur fonction est de faire en sorte que les réels effecteurs de l'apoptose, c'est-à-dire les protéines proapoptotiques multidomaines de la famille Bcl-2, Bax et Bak, puissent elles-mêmes être activées et former des pores dans la membrane externe de la mitochondrie. Bak est une protéine intégrée en tout temps dans la membrane externe de la mitochondrie, alors que Bax est cytosolique et peut être incorporée dans cette membrane en réponse à des stimuli apoptogènes (Plati et al., 2011). Ainsi, Bak et Bax peuvent s'homo-oligomériser dans la membrane externe de la mitochondrie et créer des pores, et c'est ce qui cause la perméabilisation de cette membrane et représente l'événement déclencheur crucial de la réponse apoptotique (Strasser et al., 2011). En fait, l'action des protéines BH3 est très importante pour que cet événement se produise, et celles-ci agissent de deux façons différentes dans ce but. Afin d'éviter que l'apoptose se produise en absence de stimulus adéquat, les protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent s'associer directement soit avec les protéines BH3 ou avec les protéines proapoptotiques multidomaines et les séquestrer pour les

empêcher d'agir. Dans le premier modèle d'action des protéines BH3, celui de l'activation directe, certaines protéines BH3 sont des activateurs (Bim, Bid et Puma), qui peuvent lier Bax et Bak directement et induire leur oligomérisation (Fig. 12A). Dans ce cas, les protéines antiapoptotiques sont déplacées des activateurs par des protéines BH3 sensibilisatrices (Bad, Bik, Noxa, etc), ce qui permet aux activateurs de s'associer alors avec Bax et Bak (Chipuk et al., 2010; Strasser et al., 2011). Le second modèle d'activation est le modèle d'activation indirecte, dans lequel les protéines antiapoptotiques sont plutôt associées aux effecteurs Bak et Bax et les gardent séquestrés à l'abri des protéines BH3. Cependant, lorsque les membres BH3 sont activés, ils peuvent former des hétérodimères avec les protéines antiapoptotiques comme Bcl-2 et donc libérer les effecteurs (Fig. 12B). Il semble en fait que ce soit un amalgame des deux modèles qui se produise en réalité. Par exemple, pour garantir l'apoptose, non seulement Bim doit pouvoir s'associer avec toutes les protéines Bcl-2 antiapoptotiques, mais son union directe avec l'effecteur Bax soutient une réponse apoptotique encore plus importante (Merino et al., 2009).

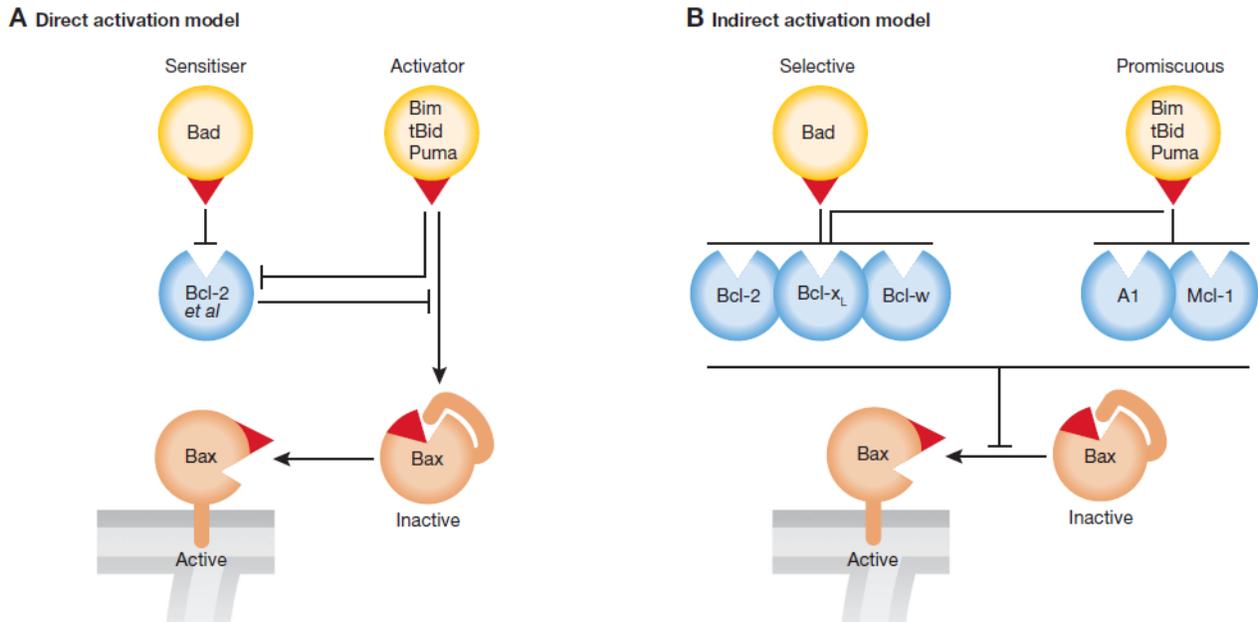


Figure 12. Modèles d'activation des effecteurs Bax et Bak par les protéines BH3.

a) Modèle d'activation directe, dans lequel la protéine sensibilisatrice Bad s'associe avec la protéine Bcl-2, qui était auparavant liée à un des activateurs comme Bim. L'activateur peut alors directement activer Bax. b) Modèle d'activation indirecte, dans lequel Bax est

normalement séquestrée par les protéines antiapoptotiques, qui sont alors déplacées de Bax lorsque liées par les protéines BH3 comme Bad et Bim. Tiré de (Strasser et al., 2011).

3.1.2 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque menant à l'apoptose est contrôlée par quelques récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands spécifiques. Les principaux couples de récepteurs-ligands connus pour leur implication dans l'exécution de l'apoptose sont TNF-R1, le récepteur du TNF (*tumour necrosis factor*), Fas, ou CD95, et son ligand FasL, ainsi que les récepteurs du TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), DR4 et DR5 (Jin and El-Deiry, 2005). En fait, TNF est responsable de la mise en marche de plusieurs voies de signalisation distinctes, dont une voie menant à l'activation de NF- κ B, ce qui favorise la survie cellulaire plutôt que l'apoptose, mais l'apoptose peut être déclenchée par TNF-R1 et ses protéines associées, lorsque la voie menant à l'activation de NF- κ B est inhibée (Jin and El-Deiry, 2005). FasL et TRAIL ont quant à eux un rôle plus direct dans la régulation menant la cellule vers sa mort. Leur reconnaissance par leurs récepteurs spécifiques permet la formation d'un complexe de signalisation induisant la mort ou DISC (*death-inducing signaling complex*). Ceci se fait grâce à l'interaction entre les domaines de mort (DD) des récepteurs avec ceux de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated death domain*) (Chinnaiyan et al., 1995). FADD possède également un domaine DED (*death effector domain*) qui assure le recrutement de la procaspase 8, via son propre domaine DD. Le recrutement de plusieurs procaspases 8 dans des complexes DISC permet leur dimérisation et leur autoprotéolyse et par conséquent, l'activation de la voie des caspases à partir de la caspase 8 (voir ci-dessous) (Jin and El-Deiry, 2005).

Les voies intrinsèque et extrinsèque ne sont pas nécessairement indépendantes. En effet, un exemple d'un mécanisme qui supporte l'activation de la voie intrinsèque et la perméabilisation de la mitochondrie à partir de la liaison d'un ligand à son récepteur de mort est le clivage de Bid par la caspase 8 (voir la figure 10 ou la figure 13). La forme tronquée de Bid (ou tBid) constitue sa forme active et c'est celle-ci qui est responsable de l'activation de Bax et de Bak à la mitochondrie (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). De la même façon, des stimuli qui activent la voie intrinsèque peuvent aussi agir sur des régulateurs qui font

habituellement partie de la voie extrinsèque. Ainsi la caspase 6, qui est activée grâce à la voie intrinsèque, peut elle-même aller cliver la caspase 8, sans qu'un récepteur de mort soit impliqué (Cowling and Downward, 2002). De plus, des dommages à l'ADN qui régulent de façon positive l'activité de p53 peuvent non seulement soutenir l'expression de cibles directes de p53 comme Puma et Noxa, mais aussi FasL et le récepteur DR5, ce qui pourrait aussi favoriser l'activation de la voie extrinsèque en plus de la voie intrinsèque (Jin and El-Deiry, 2005).

3.1.3 Les caspases

En fin de compte, les voies intrinsèque et extrinsèque sont toutes deux responsables de l'activation des caspases. Il existe trois types différents de caspases : les caspases impliquées dans la réponse inflammatoire (1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14), qui n'ont pas de rôle connu dans l'apoptose, les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices ou exécutrices (3, 6 et 7) (Prabhudesai et al., 2007; Strasser et al., 2011). Les caspases initiatrices possèdent de longs prodomaines qui contiennent soit un domaine de mort (DD) ou un domaine CARD, c'est-à-dire un domaine de recrutement et d'activation de caspase. Ces domaines leur permettent d'interagir avec des protéines adaptatrices ou d'échafaudage. Effectivement, la procaspase 8 peut interagir avec FADD via son domaine DD et la procaspase 9 s'associe avec APAF1 grâce à son domaine CARD. Les procaspases initiatrices sont donc responsables de leur propre clivage protéolytique menant à la formation d'un complexe tétramérique constituant la caspase active (Jin and El-Deiry, 2005; Strasser et al., 2011). Les caspases initiatrices sont alors capables de cliver les caspases exécutrices, qui ne possèdent pas de longs prodomaines, qui peuvent alors cliver tous leurs substrats cellulaires.

Les substrats des caspases associées à l'apoptose sont extrêmement variés et il en existerait plus de 400 connus jusqu'à maintenant (Luthi and Martin, 2007). Le clivage d'un grand nombre de ces substrats a une influence directe sur les changements morphologiques qui se produisent dans les cellules apoptotiques, mais le clivage de plusieurs autres protéines dans le processus apoptotique ne semble pas avoir un effet direct sur le phénotype observé, selon ce qui est connu aujourd'hui (revue dans (Taylor et al., 2008)). Les caspases affectent d'abord plusieurs composants du cytosquelette, comme l'actine et la tubuline, mais aussi plusieurs

protéines associées aux filaments d'actine et aux microtubules (Taylor et al., 2008). Ceci favorise ainsi le bourgeonnement de la membrane plasmique, caractéristique de l'apoptose. Certains filaments intermédiaires sont également affectés, les lamines nucléaires étant clivées par les caspases, et cet événement est le premier menant vers la rupture de la membrane nucléaire et à la fragmentation de la chromatine (Rao et al., 1996). La fragmentation de la chromatine elle-même est majoritairement due à l'activité de l'ADNase activée par les caspases ou CAD, qui est activée par la coupure de son inhibiteur (ICAD) par les caspases exécutrices (Sakahira et al., 1998). Certains autres événements de clivage sont importants pour inhiber la transcription et la traduction dans la cellule affectée. De la sorte, plusieurs facteurs de transcription sont touchés, tout comme de nombreux facteurs d'initiation de la traduction, ainsi que des protéines ribosomales (Taylor et al., 2008). Le fonctionnement de la mitochondrie, bien qu'initialement affecté par les protéines de la famille Bcl-2, est aussi inhibé par l'action des caspases. En effet, les caspases clivent NDUFS1, l'unité p75 du complexe respiratoire I de la mitochondrie. Ceci a pour effets la perturbation du transport d'électron et du potentiel transmembranaire, la production d'espèces réactives d'oxygène et la perte de l'intégrité structurale de cette organite, ce qui peut avoir pour conséquence de retarder d'autres événements de l'apoptose (Ricci et al., 2004). Enfin, d'autres substrats des caspases sont des protéines impliquées dans la réparation de dommages à la cellule, de dommages à l'ADN, par exemple, comme les protéines PARP, DNA-PK, Rad51 et ATM (Jin and El-Deiry, 2005). L'apoptose étant en général enclenchée lorsque les dommages à l'ADN sont trop considérables pour être réparés, il semble qu'il soit préférable que les mécanismes de réparation soient évités, étant trop énergivores pour la cellule qui doit consacrer ses dernières énergies à promouvoir sa mort (Jin and El-Deiry, 2005).

3.1.4 Autres régulateurs de l'apoptose

L'apoptose devant être un processus régulé finement, plusieurs niveaux de régulation existent, dont certains seront abordés ici. L'activité elle-même des caspases peut être contrôlée de façon négative par des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), famille dont font partie XIAP, cIAP1, cIAP2 et survivine. Elles peuvent agir de multiples façons pour inhiber l'apoptose, dont en interagissant directement avec les caspases, comme c'est le cas pour XIAP

(Plati et al., 2011). Ces protéines possèdent aussi une activité E3 ubiquitine ligase, ce qui peut mener à la dégradation par le protéasome des protéines auxquelles elles sont unies. Également, les IAP peuvent agir dans la voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose, principalement lorsque le TNF est impliqué. En effet, les IAP peuvent collaborer avec le TNF pour stimuler l'activation des facteurs de transcription NF- κ B pour favoriser la survie cellulaire et inhiber l'apoptose engendrée via la caspase 8 (Plati et al., 2011). De la même façon, la protéine c-FLIP (*cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*) peut aussi moduler la signalisation de la voie extrinsèque en s'associant au complexe DISC et contrôler le niveau d'activation de la caspase 8, en fonction notamment de son niveau d'expression comparativement à celui de la procaspase 8 (Chang et al., 2002; Irmeler et al., 1997).

Les IAP peuvent elles-mêmes être négativement régulées par certaines protéines qui sont libérées de l'espace intermembranaire de la mitochondrie en même temps que le cytochrome c. Les deux plus connues sont SMAC/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low PI*) et OMI/Htr2A (Fig. 10) et elles peuvent interagir directement avec les IAP pour inhiber leur effet négatif sur l'activité des caspases (Plati et al., 2011). Deux autres molécules qui sont relâchées de la mitochondrie lors de la perméabilisation de la membrane externe par Bax et/ou Bak sont AIF (*apoptosis-inducing factor*) et endoG, qui sont toutes deux reliées soit à la condensation de la chromatine ou à la fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose (Fig. 10). Contrairement à CAD, leur activité n'est pas dépendante de celle des caspases (Jin and El-Deiry, 2005). La figure 13 montre de façon simplifiée comment toutes les voies menant à l'apoptose sont reliées entre elles et comment l'addition de tous les niveaux de contrôle permet une régulation très précise. Elle montre aussi à quel point p53 peut être un régulateur majeur de l'apoptose, peu importe la voie qui est impliquée.

Finalement, l'aboutissement de toutes les voies apoptotiques est la phagocytose des corps apoptotiques et du restant des cellules mourantes par les cellules environnantes. Afin que ce processus se produise, la cellule apoptotique doit émettre des signaux qui seront reconnus par les cellules autour afin de les avertir de sa mort imminente. Cet événement est crucial étant donné qu'il permet d'éviter la libération dans l'environnement extracellulaire de

constituants de la cellule mourante, ce qui pourrait causer une réponse inflammatoire et immunitaire potentiellement dommageable pour les cellules avoisinantes (Taylor et al., 2008). Une des façons pour la cellule d'attirer l'attention de macrophages pouvant l'engloutir est de sécréter des facteurs chimiotactiques. Un tel facteur ayant été identifié est la lysophosphatidylcholine, dont la sécrétion dépend de l'activité de la caspase 3 (Lauber et al., 2003). Par la suite, pour que les phagocytes reconnaissent de façon précise la cellule apoptotique, celle-ci peut exposer certaines molécules à sa surface. La mieux caractérisée est la phosphatidylsérine, un lipide qui se trouve habituellement dans le feuillet interne de la membrane plasmique, mais est transporté très tôt dans le feuillet externe lors du déclenchement de l'apoptose (Martin et al., 1995). La façon dont cet événement se produit et le récepteur présent sur les phagocytes qui permet la reconnaissance de la phosphatidylsérine n'est pas très bien défini, mais il semble bien que ce processus aussi soit dépendant de l'activité des caspases (Taylor et al., 2008).

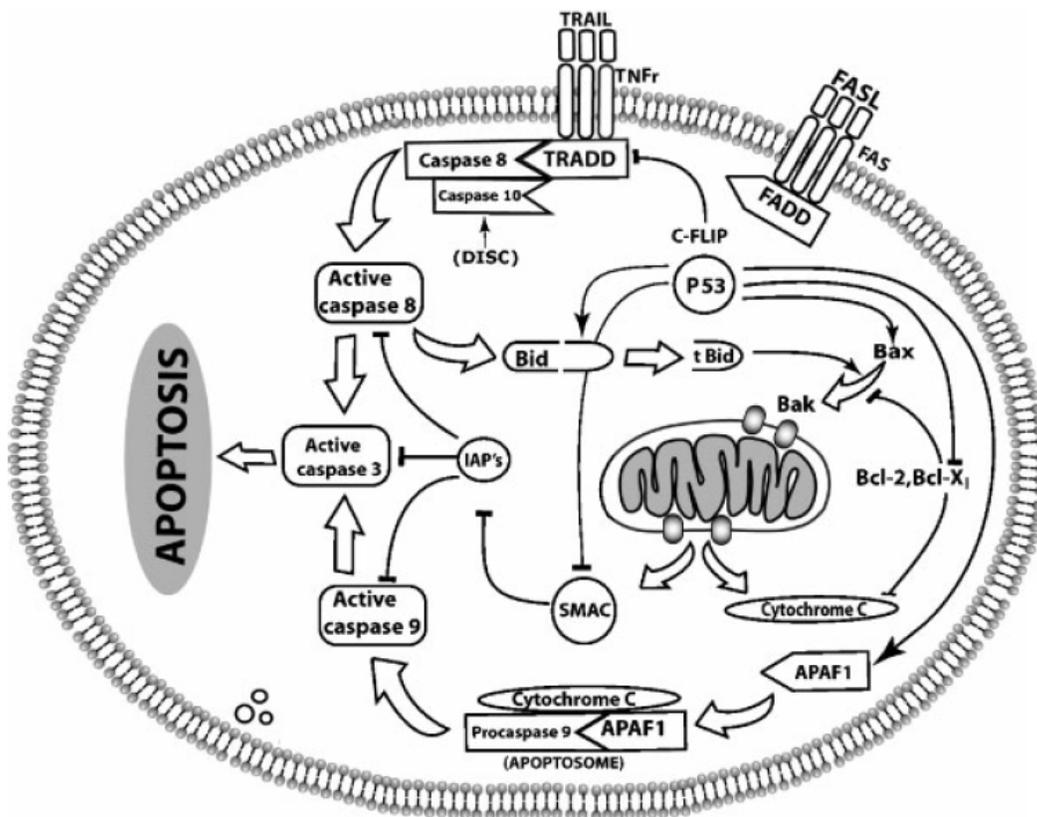


Figure 13. Interactions entre les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

Voir détails dans le texte principal. Tiré de (Prabhudesai et al., 2007).

3.1.5 Traitement de tumeurs résistantes à l'apoptose

Non seulement les cellules qui sont en voie de devenir tumorales montrent des signes de prolifération incontrôlée, une autre caractéristique typique de leur transformation est un certain blocage des voies apoptotiques. Ceci peut se faire de plusieurs façons, les plus communes étant l'inhibition de l'expression ou la mutation du suppresseur de tumeur p53 ou des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2, ou encore la surexpression des protéines Bcl-2 antiapoptotiques ou de certaines IAP, comme XIAP et survivine. Une difficulté supplémentaire se présente donc lors des tentatives de traitements antitumoraux, étant donné que les cellules cancéreuses sont enclines à montrer des signes de résistance aux drogues qui promeuvent habituellement l'apoptose comme réponse principale.

Dans les dernières années, des tentatives de développer des composés permettant de passer outre les mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses ont été réalisées. Un des exemples intéressants de ce type de composé est ce qu'on nomme les mimétiques des BH3 (revue dans (Kang and Reynolds, 2009)). Ainsi, le composé ABT-737 peut interagir directement avec certaines des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W) étant donné sa ressemblance structurale avec les protéines proapoptotiques BH3, et libère donc ces dernières pour qu'elles puissent jouer leur rôle dans la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Oltersdorf et al., 2005). Ce composé peut agir seul dans certains types de cancers, mais peut aussi favoriser les traitements plus traditionnels, comme la chimiothérapie et les radiations, lorsqu'utilisé en simultané (Oltersdorf et al., 2005).

Une autre classe de composés assez récents comprend des mimétiques de SMAC/DIABLO, un antagoniste des IAP. Ces mimétiques de SMAC sont de petites molécules qui peuvent s'associer aux domaines fonctionnels de quelques-unes des protéines de la famille des IAP, et ainsi les empêcher d'entrer en interaction avec les caspases et d'inhiber leur activité, et peuvent aussi permettre leur auto-ubiquitination, ce qui mène à leur dégradation par le protéasome (Mannhold et al., 2010). Tout comme les mimétiques des BH3, les mimétiques de SMAC peuvent agir seuls ou encore en synergie avec d'autres types de traitements.

D'autres types de composés de ce genre sont en ce moment étudiés de façon clinique pour vérifier leur activité réelle dans le traitement contre le cancer. Ces études cliniques montrent toutefois que l'utilité de ces composés varie grandement en fonction des différents organes affectés et même en fonction de différentes tumeurs individuelles (Plati et al., 2011). Il faut aussi s'assurer que les nouvelles drogues qui sont développées présentent une toxicité moins grande pour les cellules normales, puisque ceci demeure un problème majeur dans l'utilisation des chimiothérapies courantes.

3.2 Les autres formes de mort cellulaire programmée

L'apoptose a longtemps été considérée comme étant la seule forme de mort programmée qui pouvait être déclenchée par des signaux de stress tels que des dommages à l'ADN, mais d'autres formes de mort cellulaire programmée sont aujourd'hui connues et de plus en plus étudiées. En effet, il semble que ces différentes façons pour la cellule de se suicider pourraient avoir un rôle important à jouer dans la réponse aux divers traitements contre le cancer et dans la mort de la cellule souhaitée lors de l'application de ces traitements (de Bruin and Medema, 2008; Kreuzaler and Watson, 2012). Deux autres formes prévalentes de mort cellulaire sont la nécrose programmée et l'autophagie.

3.2.1 La nécrose programmée

On a longtemps pensé que la nécrose cellulaire ne se produisait que de façon accidentelle et non d'une manière contrôlée en réponse à un stimulus particulier. La nécrose se caractérise ainsi par la vacuolisation du cytoplasme, le gonflement de la cellule et la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, ce qui cause en conséquence la libération de plusieurs composants intracellulaires dans l'environnement de la cellule et une réponse immunitaire due à cette relâche d'ADN, de protéines et/ou d'organites de la cellule nécrotique (de Bruin and Medema, 2008). Le premier indice montrant la possibilité que la nécrose puisse être induite de façon précise est venue d'une étude signalant que le TNF peut déclencher une réponse nécrotique dans certains types cellulaires, incluant les modifications phénotypiques mentionnées ci-dessus (Laster et al., 1988). Il a ensuite été montré que cette réponse est

particulièrement importante lorsque les caspases sont inactivées. En effet, plutôt que d'empêcher la mort cellulaire, l'inhibition des caspases permet à la nécrose d'agir en renfort, surtout grâce à la très grande production d'espèces réactives de l'oxygène (Lemaire et al., 1998; Vercammen et al., 1998).

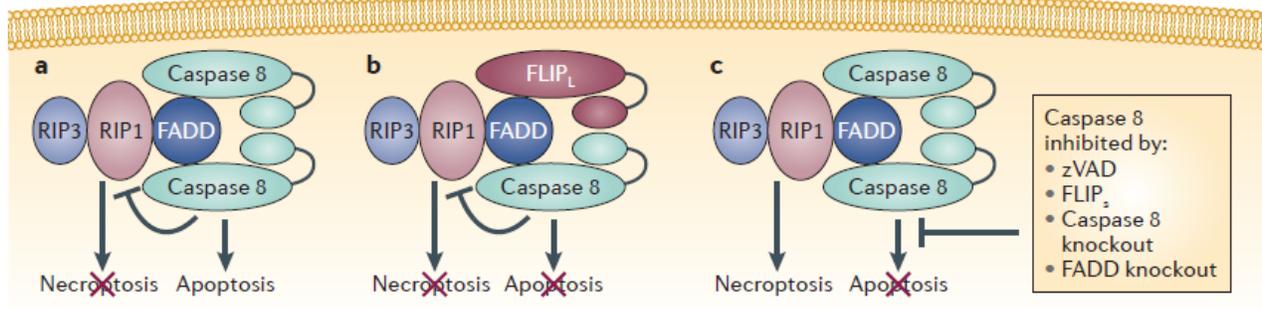


Figure 14. Le Ripoptosome et son influence sur le déclenchement de l'apoptose ou de la nécrose.

a) Si la caspase 8 est active, elle réprime RIP1 et la réponse préférée est l'apoptose. b) L'inhibiteur FLIP réprime la caspase 8, mais l'activité résiduelle de la caspase 8 est suffisante pour inhiber aussi RIP1, et alors ni l'apoptose, ni la nécrose ne sont activées. c) L'inhibition de l'activité de la caspase 8 évite à RIP1 d'être clivée et c'est la nécrose qui est favorisée. Tiré de (Kreuzaler and Watson, 2012).

Une réponse nécrotique peut aussi être observée à la suite de signaux de stress intracellulaires comme des dommages à l'ADN. Dans ce cas, il y a formation d'un complexe similaire à l'apoptosome ou au DISC, le Ripoptosome (Kreuzaler and Watson, 2012). Le Ripoptosome est constitué par l'association de la caspase 8, de l'adaptateur FADD et des kinases RIP1 et RIP3 (*receptor-interacting protein 1/3*) (Fig. 14) (Tenev et al., 2011). En fonction du contexte, le Ripoptosome peut déclencher l'apoptose ou la nécrose. Par exemple, si la caspase 8 est active, la réponse nécrotique est alors inhibée en raison du clivage de RIP1 par la caspase 8, tandis que l'inhibition de la caspase 8 de différentes façons engendre la nécrose (Fig. 14). Cependant, les deux réponses peuvent être inhibées si des IAP sont surexprimées ou encore par la présence de la protéine FLIP liée à la caspase 8, dont le

mécanisme d'action est semblable à celui des IAP (Tenev et al., 2011). Dans ce cas, FLIP, par exemple, inhibe la majorité de l'activité de la caspase 8 mais assure tout de même une activité résiduelle qui permet à la caspase 8 de cliver RIP1 et d'empêcher la nécrose (Kreuzaler and Watson, 2012). L'activité des kinases RIP1 et RIP3 est essentielle à la réalisation de la nécrose, néanmoins leurs cibles ne sont pas très bien caractérisées et on ne sait pas encore trop de quelle façon elles peuvent être à l'origine des modifications morphologiques typiques de la nécrose (Kreuzaler and Watson, 2012). Ces kinases semblent toutefois en mesure d'accélérer le métabolisme et ainsi de moduler la production d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui contribuerait au déclenchement de la nécrose (Zhang et al., 2009).

3.2.2 L'autophagie

L'autophagie est typiquement un processus employé par la cellule pour assurer sa survie dans les cas où certaines de ses organites sont endommagés ou encore lorsqu'elle est en manque de nutriments. La cellule favorise alors la formation d'autophagosomes, des vésicules qui englobent les organites endommagés (ou non, dans le cas où la cellule est en manque de nutriments), et ceux-ci fusionnent alors avec les lysosomes afin d'assurer la digestion des organites en question (de Bruin and Medema, 2008; Kreuzaler and Watson, 2012). De prime abord, l'autophagie semble donc avoir un effet protecteur pour la cellule, et cet effet est aussi observé dans certains types cellulaires lors de la réponse à certaines drogues génotoxiques. Effectivement, l'autophagie peut entraîner un délai dans l'exécution de la voie intrinsèque de l'apoptose en digérant les mitochondries ayant été perméabilisées par les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2, et ce délai peut être annulé en réprimant l'induction de l'autophagie (Abedin et al., 2007).

Des évidences montrent nonobstant que l'autophagie pourrait favoriser la mort cellulaire, soit lorsque l'autophagie est activée jusqu'au point où elle digère presque tous les composants cellulaires, soit lorsque la quantité de mitochondries digérées (mitophagie) devient trop élevée pour soutenir la survie de la cellule (de Bruin and Medema, 2008; Kreuzaler and Watson, 2012). Aussi, il a été montré que dans des cellules dans lesquelles l'apoptose est déficiente, ce qui se produit souvent dans les cas réels de cancer, l'induction de l'autophagie permet à ces cellules d'être tout de même sensibles à un traitement à la radiation

(Kim et al., 2006). Néanmoins, il faut être prudent avant de vouloir provoquer l'autophagie dans des cellules cancéreuses lors de la mise au point d'un traitement, puisque, parfois, il semble plutôt que l'inhibition de ce processus catabolique soit souhaitable afin de favoriser la mort des cellules.

Puisque l'objectif de tout traitement contre le cancer demeure la mort des cellules affectées et la survie des cellules normales, la réponse qui est réellement engendrée par ce traitement importe peu, tant qu'elle mène les cellules cancéreuses vers leur fin. L'apoptose demeure toutefois le mécanisme le mieux caractérisé et celui qui cause le moins de dommages à l'environnement extracellulaire. Connaître les régulateurs de l'apoptose provoquée par les différents types de traitements, que ce soit du plus crucial au moins important demeure alors une priorité dans la recherche portant sur le cancer.

4. Les grands régulateurs de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN : p53 et E2F

Les fonctions des facteurs de transcription p53 et E2F sont variées, certaines des fonctions de p53 ont d'ailleurs été abordées dans les sections précédentes. Par conséquent, cette section sera principalement consacrée à la présentation de leurs fonctions dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN, et plus précisément dans l'induction de l'apoptose suite à un tel stress.

4.1 p53 : régulation sélective de l'apoptose?

La protéine p53 se retrouve au centre d'un immense réseau permettant à la cellule de riposter à divers stress en générant plusieurs types de réponses, certaines de celles-ci semblant même parfois contradictoires au premier coup d'œil (Fig. 15). Ces fonctions de p53 sont en général assurées par son rôle de régulateur transcriptionnel, soit positif ou négatif, bien que des fonctions possibles de p53 indépendantes de son rôle dans la transcription soient aussi étudiées (Murray-Zmijewski et al., 2008). La régulation de p53 elle-même est très complexe et

une grande question se pose : comment p53 permet-elle la régulation sélective de ses gènes cibles afin de déclencher une réponse spécifique et appropriée au stress encouru?

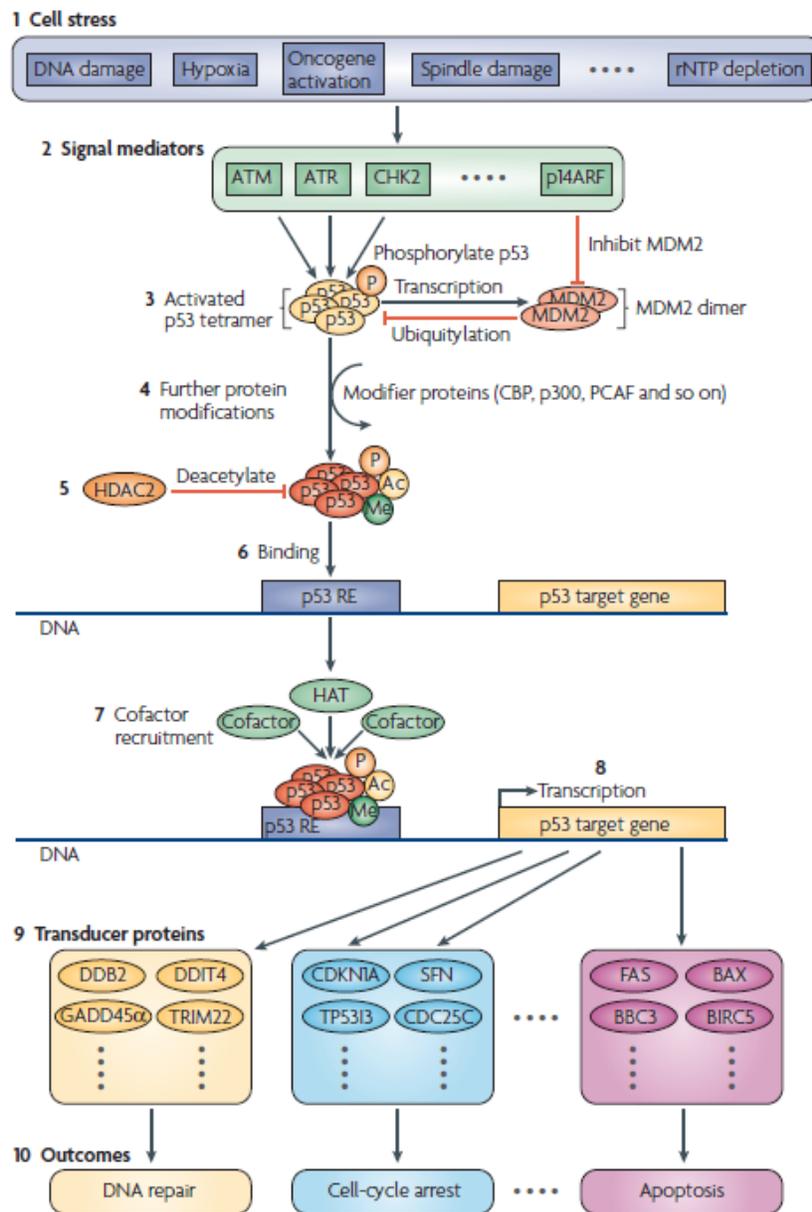


Figure 15. La régulation de p53 et de ses gènes cibles.

La cellule est soumise à divers stress (1) et des médiateurs du signal activent p53 grâce à des modifications posttraductionnelles sur p53 ou son régulateur Mdm2 (2). Un tétramère de p53 se forme alors (3) et est soumis à d'autres modifications (4, 5). p53 reconnaît ensuite son élément de réponse dans l'ADN (6) et assure le recrutement de cofacteurs pour activer ou

réprimer la transcription des gènes cibles (7, 8). Les cibles codent pour plusieurs protéines (9) assurant diverses réponses cellulaires au stress initial. Tiré de (Riley et al., 2008).

4.1.1 La régulation de la transcription par p53 et sa fonction dans l'apoptose

Étant donné la grande diversité de gènes régulés par p53 (pour une liste, voir (Riley et al., 2008)), il n'est pas surprenant de constater que la réponse finale de la cellule à l'activation de p53 varie en fonction de plusieurs facteurs : le type cellulaire, le stimulus de stress, ainsi que l'intensité et la durée du stress. En effet, il a été montré que la réactivation de p53 dans des tumeurs chez la souris engendre une régression de ces tumeurs, mais le processus enclenché diffère en fonction du type de tumeur : apoptose dans les lymphomes et arrêt de prolifération cellulaire et sénescence dans les sarcomes (Ventura et al., 2007). De plus, dans de mêmes lignées de cellules humaines de cancer colorectal, des drogues différentes causant toutes deux des dommages à l'ADN peuvent occasionner des réponses distinctes. Ainsi, p53 amène ces cellules, lorsque traitées avec la doxorubicine, à arrêter leur division, alors qu'un traitement avec le 5FU entraîne une réponse apoptotique (Bunz et al., 1999). De nombreuses études ont tenté de comprendre comment p53 peut être responsable de ces divers mécanismes en fonction d'un contexte spécifique. Il n'en demeure pas moins que la régulation de l'activité de p53 est complexe et que cette spécificité de la réponse n'est pas encore tout à fait élucidée, bien que plusieurs études fassent la lumière sur certains types de régulation qui expliquent par exemple pourquoi p53 peut causer l'apoptose dans des situations caractéristiques.

L'élément fondamental de la fonction de p53 comme facteur de transcription est bien sûr la reconnaissance de l'ADN par son domaine de liaison à l'ADN (Fig. 16). Bien que p53 possède un élément de réponse consensus, c'est-à-dire deux sites RRRCWWGYYY (où R est une purine, Y, une pyrimidine et W est soit A ou T) séparés par un espaceur plus ou moins grand, la majorité des éléments de réponse liés par p53 diffèrent de cette séquence consensus par au moins une base (Espinosa, 2008; Riley et al., 2008). p53 peut activer la transcription de divers gènes cibles impliqués dans la réponse apoptotique, dont des gènes codant pour des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2, soit *Bax*, *Puma* et *Noxa*, ainsi que des gènes codant pour des récepteurs de mort cellulaire, *Fas* et *DR5* constituant de bons exemples (Murray-Zmijewski et al., 2008; Riley et al., 2008). Pour tenter d'expliquer comment p53 peut

préférentiellement moduler l'expression d'un groupe de gènes, par exemple des gènes codant pour des régulateurs de l'apoptose, plutôt que celle d'un autre groupe de gènes, ceux-ci codant pour des protéines responsables de l'arrêt du cycle cellulaire, comme *p21*, Espinosa a présenté deux modèles différents. Le premier modèle est celui de la liaison sélective, dans lequel p53 ne s'associe qu'aux promoteurs qu'elle doit réguler en réponse à un stimulus précis (Espinosa, 2008). Néanmoins, il ne semble pas y avoir de différences notables entre les éléments de réponse de p53 en fonction du groupe de gènes qu'il régule, peu importe les fonctions de ces gènes (Espinosa, 2008). Aussi, une étude à grande échelle montre que p53 peut s'associer à pratiquement tous ses éléments de réponse de promoteurs connus peu importe le stress qui est infligé à la lignée cellulaire employée, ou encore peu importe si ces cellules sont destinées à mourir ou seulement à arrêter leur cycle cellulaire (Shaked et al., 2008). Ces évidences semblent montrer que la spécificité démontrée par p53 parmi ses nombreuses fonctions ne se limite pas à sa capacité de lier l'ADN.

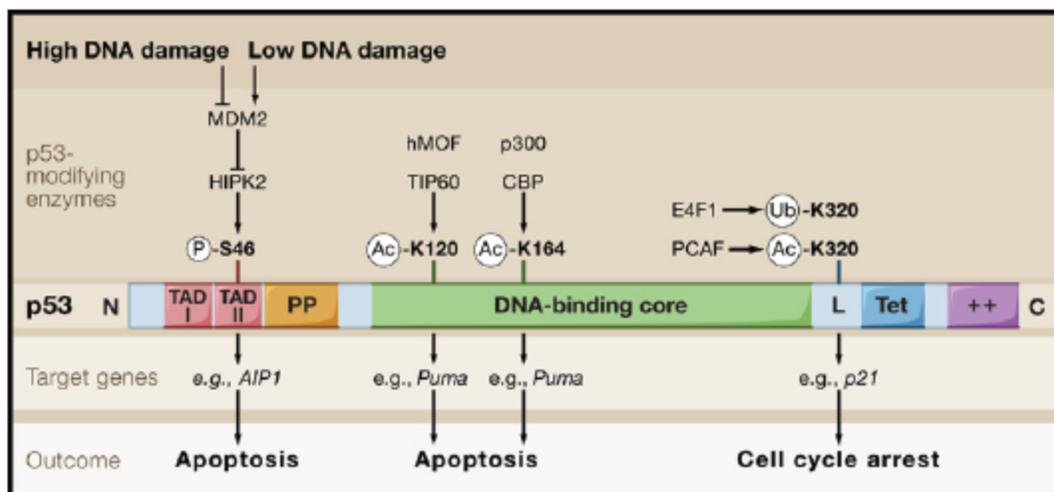


Figure 16. Certaines modifications de p53 peuvent expliquer la spécificité de sa fonction.

La figure montre certaines modifications posttraductionnelles qui peuvent affecter la spécificité de régulation que démontre p53 face à ses gènes cibles, ainsi que le destin cellulaire qui en découle. TAD I et TAD II sont les domaines de transactivation de p53, PP est un domaine riche en prolines, le *DNA-binding core* est le domaine de liaison à l'ADN, Tet est le domaine de tétramérisation et ++ est le domaine C-terminal. Tiré de (Vousden and Prives, 2009).

Le second modèle proposé par Espinosa est le modèle du contexte sélectif, dans lequel la spécificité de p53 est plutôt décidée à la suite de sa liaison à l'ADN, par exemple par des modifications posttraductionnelles et le recrutement de cofacteurs, la modification des histones et de la chromatine, ainsi que la régulation de l'activité de l'ARN polymérase (Fig. 15,16) (Espinosa, 2008). Certains voient cette régulation de la singularité de p53 plutôt comme un code-barres, dont chacune des barres représenterait soit une modification de p53, ou un cofacteur, ou encore une localisation différente de p53, et l'ensemble du code-barres permettrait ainsi de définir l'action exacte de p53 en réponse à un stimulus précis (Murray-Zmijewski et al., 2008). De toute évidence, le but n'est pas ici de définir toutes les modifications possibles de p53 ou tous ses cofacteurs connus, mais plutôt de mettre l'accent sur certaines études montrant comment certaines façons de réguler p53 peuvent directement influencer son rôle dans l'apoptose.

Tel que mentionné dans la section 2.2.3, p53, ainsi que son régulateur négatif l'ubiquitine ligase Mdm2, peuvent être phosphorylés par plusieurs kinases impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Fig. 15). Plusieurs acides aminés de p53 peuvent être phosphorylés, mais la phosphorylation d'une sérine en particulier a été impliquée dans l'induction de l'apoptose, celle de la sérine 46. Celle-ci peut être phosphorylée par la kinase HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) en réponse à des rayons UV (Fig. 16) ou encore par DYRK2 (*dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2*) à la suite de divers stress génotoxiques (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Taira et al., 2007). Il a été démontré *in vivo* que la phosphorylation de Ser46 est importante pour déclencher l'apoptose lorsque des dommages à l'ADN se produisent, ce qui pourrait être expliqué par la transcription préférentielle par p53 de sa cible *p53AIP1* (*p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*) (Feng et al., 2006; Oda et al., 2000). *p53AIP1* est une protéine impliquée dans la relâche du cytochrome c de la mitochondrie, qui est sans contredit un élément décisif de l'apoptose (Vousden and Prives, 2009). Néanmoins, cet événement de phosphorylation ne se produit que lorsque des quantités irréparables de dommages à l'ADN sont observées, sinon, Mdm2 demeure activée et est capable de stimuler la dégradation de la kinase HIPK2, ce qui montre que la régulation de l'activité de p53 est tout à fait dépendante du niveau de stress subi par les cellules (Fig. 16) (Rinaldo et al., 2007).

D'autres types de modifications posttraductionnelles sont en mesure de réguler l'activité de p53, dont l'acétylation (Fig. 15,16). Une des lysines dont l'acétylation est cruciale pour l'induction de l'apoptose est la Lys120 dans le domaine de liaison à l'ADN (Fig. 16). Celle-ci est modifiée par les acétyltransférases hMOF et TIP60 et cette acétylation semble nécessaire pour activer préférentiellement la transcription de gènes proapoptotiques comme *Bax et Puma*, alors que l'expression de *p21* n'est pas affectée (Sykes et al., 2006; Tang et al., 2006). La modification de cette lysine constitue sans doute un événement important, étant donné que la lysine est souvent mutée pour une arginine dans certains cancers, l'arginine ne pouvant pas être acétylée (Sykes et al., 2006; Tang et al., 2006).

Une façon par laquelle pourraient agir ces modifications posttraductionnelles de p53 est en favorisant le recrutement différentiel de cofacteurs sur le site de liaison de p53 sur ses promoteurs cibles, que ce soit les facteurs de transcription de base ou des facteurs plus spécifiques. Les modifications de p53 pourraient par exemple causer un changement dans la conformation de la protéine, p53 étant une protéine assez flexible, et ce changement pourrait aider à exposer le domaine de liaison à l'ADN ou encore favoriser le recrutement d'autres protéines (Gu and Zhu, 2012). En effet, certaines protéines possèdent des domaines bien définis qui peuvent reconnaître certaines modifications posttraductionnelles sur d'autres protéines et favoriser l'association entre les deux (Gu and Zhu, 2012). La phosphorylation de Ser46, entre autres, peut servir de site d'arrimage pour le domaine WW de la protéine Pin1, une prolyl isomérase, qui peut alors déplacer la protéine inhibitrice de la famille des ASPP (*apoptosis-stimulating proteins of p53*), iASPP, ce qui promeut la mort cellulaire (Mantovani et al., 2007; Zheng et al., 2002). ASPP1 et ASPP2, les protéines proapoptotiques de cette famille, se lient quant à elles au domaine de liaison à l'ADN de p53, et stimulent sa liaison à l'ADN et son activation transcriptionnelle de ses cibles proapoptotiques, alors qu'elles n'ont aucun effet sur son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire (Samuels-Lev et al., 2001).

La régulation de p53 est d'autant plus complexe que différents isoformes de p53 existent, en raison d'événements d'épissage alternatif, et que d'autres protéines de même famille que p53, soit p63 et p73, ainsi que leurs nombreux isoformes, peuvent aussi gérer la réponse cellulaire à un stress cytotoxique ou génotoxique. Un exemple qui convient à la

présente discussion est celui de l'isoforme p53 β , qui peut s'associer de façon sélective à certains promoteurs plutôt qu'à d'autres, comme au promoteur de *Bax*, et non à celui de *p21*, ce qui pourrait démontrer un rôle des différents isoformes de p53 ou des différents membres de la famille dans la spécificité de la réponse cellulaire modulée par p53 (Bourdon et al., 2005). Cette complexité s'exprime aussi par la capacité de p53 de réprimer la transcription de ces gènes cibles, en plus de l'activer (pour revue, consulter (Wang et al., 2010)). Il n'est pas évident de définir comment p53 peut choisir entre l'activation ou la répression d'une cible, mais déjà, il semble que l'élément de réponse consensus classique ne se retrouve pas dans les promoteurs des gènes réprimés par p53 (Wang et al., 2010). Certains mécanismes assurant la répression des cibles de p53 sont suggérés, comme le recrutement de cofacteurs comme des histones désacétylases, qui répriment la transcription en modifiant la structure de la chromatine, ou encore, en entrant en compétition avec des facteurs activateurs de la transcription pour la liaison de l'ADN sur des sites qui se chevauchent (Wang et al., 2010). En ce qui concerne la mise en place de l'apoptose, l'expression de certains gènes est connue pour être réprimée par p53, comme *Bcl-2*, possiblement en raison de l'interaction entre p53 et la protéine interagissant avec la boîte TATA (TBP) sur son promoteur (Wu et al., 2001).

4.1.2 Des rôles apoptotiques de p53 indépendants de la transcription?

Un autre aspect important de la régulation de p53 concerne le contrôle de sa localisation intracellulaire. Il est logique de penser que le contrôle de la localisation de p53 entre le noyau, où la protéine peut jouer son rôle de transactivateur transcriptionnel, et le cytoplasme a une importance cruciale pour son activité. Effectivement, comme discuté auparavant, un stress comme les dommages à l'ADN peut activer l'enzyme PARP1, qui peut ensuite ajouter des chaînes PAR sur p53 elle-même, ce qui l'empêche alors d'interagir avec Crm1 (*chromosome region maintenance 1*), un récepteur de l'export nucléaire, et la protéine est retenue dans le noyau (Kanai et al., 2007). D'autres mécanismes régulant la localisation de p53 entre le cytoplasme et le noyau existent également (Murray-Zmijewski et al., 2008).

Certaines études ont toutefois montré que p53 peut aussi avoir des fonctions indépendantes de son effet transcriptionnel, surtout lorsqu'elle est localisée à la mitochondrie. De façon intéressante, il semble même que le ciblage de p53 à la mitochondrie serait suffisant

pour induire l'apoptose, ce qui serait possible grâce à l'interaction entre p53 et des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bcl-xL (Mihara et al., 2003). p53 pourrait aussi favoriser l'oligomérisation de Bak et de Bax, en s'associant directement avec elles, et ainsi la relâche du cytochrome c de la mitochondrie (Chipuk et al., 2004; Leu et al., 2004). Le rôle de l'acétylation de la Lys120 de p53 dans l'induction de l'apoptose a brièvement été discuté ci-dessus et cette modification semble non seulement favoriser l'effet apoptogène de p53 au niveau de la transcription, mais aussi lors de son action au niveau de la mitochondrie. Ainsi, si l'acétylation de ce résidu est prohibée, p53 ne peut plus dissocier la protéine antiapoptotique Mcl-1 de Bak, ce qui prévient l'oligomérisation de Bak (Sykes et al., 2009).

En somme, les quelques évidences présentées dans les deux dernières sections montrant l'implication de p53 dans le destin apoptotique d'une cellule témoignent de l'importance de cette protéine lorsque la mort cellulaire est la fin souhaitée d'un traitement contre le cancer, et il est facile de comprendre comment des mutations dans la séquence de p53 peuvent avoir un rôle crucial à jouer dans la réussite ou l'échec du traitement.

4.1.3 Les mutations de p53 dans les cancers et les traitements associés

Les mutations dans la séquence en acides aminés de p53 affectent le plus souvent son domaine de liaison à l'ADN et plusieurs mutations d'un seul acide aminé dans ce domaine sont présentes dans différents cas de cancers (Muller and Vousden, 2013). Ces mutations peuvent toucher directement la capacité de p53 à s'associer à ses éléments de réponse dans les promoteurs de ses gènes cibles, mais elles peuvent aussi modifier la structure de la protéine, ce qui peut avoir des conséquences dans sa liaison autant à l'ADN qu'à d'éventuels cofacteurs (Muller and Vousden, 2013). En fait, des évidences montrent que plusieurs mutants de p53 peuvent encore lier l'ADN, mais qu'ils ne reconnaissent pas nécessairement les mêmes séquences que la protéine sauvage, ce qui fait entre autres que la présence d'un mutant de p53 dans une cellule peut être problématique dans l'induction de l'apoptose (Ludwig et al., 1996). Non seulement l'apoptose peut être inhibée, mais certains mutants de p53 peuvent même agir comme des oncogènes étant donné leur reconnaissance et leur activation différentielles de l'expression de certains gènes (Muller and Vousden, 2013). Un autre mécanisme d'action des mutants de p53 se situe dans l'interaction entre un de ces mutants et une autre protéine, par

exemple un autre facteur de transcription, afin de modifier son fonctionnement, soit en augmentant l'activité d'un facteur qui va favoriser la survie cellulaire, ou en inhibant un facteur qui contribue à l'activation de l'apoptose (Muller and Vousden, 2013). Un de ces facteurs est p73, qui est activé en réponse à la chimiothérapie et est aussi impliqué dans la mise en place de la réponse apoptotique (Strano and Blandino, 2003). Certains mutants de p53 et p73 peuvent s'associer en complexe, ce qui séquestre en fait p73 et l'empêche donc de stimuler la transcription de ses cibles impliquées dans l'apoptose (Di Como et al., 1999; Strano and Blandino, 2003). Une étude plus récente a en outre montré l'importance de TopBP1, une protéine qui lie topo II, dans cette interaction entre p73 et p53 mutant. TopBP1 est responsable, dans ce contexte, de la résistance à la chimiothérapie causée par la présence du p53 mutant (Liu et al., 2011). La présence des mutants de p53 peut donc être encore plus délétère pour les cellules cancéreuses à traiter que l'absence même de p53. Néanmoins, il semble que la possibilité de réactiver la fonction sauvage de p53 mutant afin de traiter le cancer soit de plus en plus envisageable.

La figure 17 montre différentes avenues pharmacologiques qui sont étudiées afin de retrouver le plus possible la fonction de suppresseur de tumeur de p53 dans des cellules cancéreuses. Plusieurs études ont porté sur l'identification de composés qui pourraient permettre de réactiver cette fonction de p53 dans des cellules qui expriment une copie mutante de la protéine. Des composés comme PRIMA-1 et CP-31398 ont été identifiés comme pouvant s'associer avec le domaine de liaison de certains des mutants connus de p53 et redonner ainsi à la protéine une conformation sauvage et ses fonctions dans l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'activation de l'apoptose (Foster et al., 1999; Lambert et al., 2009; Lambert et al., 2010). Aussi, étant donné la séquestration de p73 par p53 mutant, certaines molécules synthétiques ont été développées, dont RETRA, qui permet de relâcher p73 et de lui permettre d'activer ses gènes cibles pour amorcer une réponse apoptotique (Kravchenko et al., 2008).

Lorsque p53 est normal dans une cellule cancéreuse, sa régulation peut toutefois être négativement affectée par la surexpression de Mdm2. Ceci a poussé l'élaboration de composés qui pourraient abolir l'interaction entre les deux protéines, dont nutlin-3, qui interagit avec la poche de liaison à p53 sur Mdm2, ainsi que RITA, qui s'associe plutôt avec la poche de

liaison de Mdm2 sur p53 (Fig. 17) (Issaeva et al., 2004; Vassilev et al., 2004). Enfin, plusieurs études portent aussi sur le développement de la thérapie génique afin de stimuler l'expression de p53 (ou de p73) dans des tumeurs à l'aide d'adénovirus (AD-p53, Advexin, Gendicine) (Zuckerman et al., 2009). La mise au point de ces nouveaux traitements plus spécifiques que les drogues génotoxiques pourra éventuellement améliorer l'efficacité des traitements et en diminuer la toxicité, bien que plusieurs de ces traitements d'appoint doivent toujours être employés en combinaison avec la chimiothérapie classique.

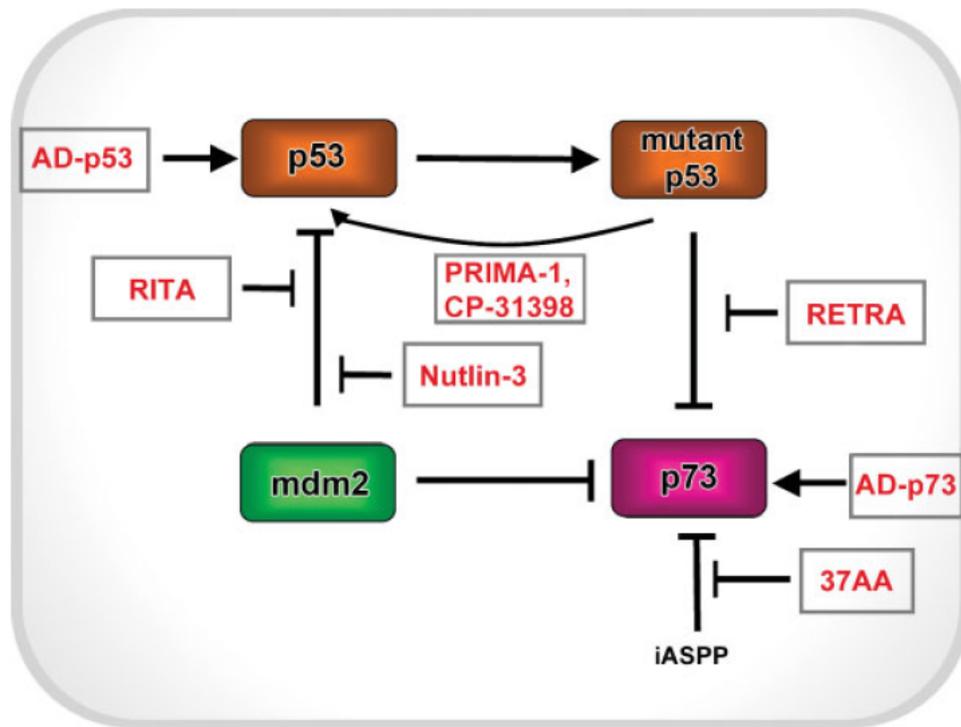


Figure 17. Mise au point de nouveaux composés pharmacologiques permettant de stimuler les fonctions de p53 dans la suppression de tumeurs.

Voir explications dans le texte principal. Tiré de (Zuckerman et al., 2009).

4.2 La famille E2F : rôles multiples

La famille E2F comprend 8 gènes, qui codent pour 9 protéines différentes, qui agissent comme facteurs de transcription dans des fonctions cellulaires variées. Traditionnellement, les E2F sont divisés en facteurs activateurs (E2F1-3a) et répresseurs de la transcription (E2F3-8)

(Engelmann and Putzer, 2010; Iaquina and Lees, 2007). Néanmoins, de plus en plus d'évidence montrent que la situation n'est pas si simple et que les facteurs activateurs peuvent agir en tant que répresseurs, et vice-versa, en fonction du contexte cellulaire (Biswas and Johnson, 2012; Chong et al., 2009; Lee et al., 2011). E2F1-6 doivent dimériser avec un des trois partenaires de la famille DP afin de s'associer à l'ADN du promoteur de leurs gènes cibles, alors qu'E2F7 et E2F8 sont considérés comme des facteurs E2F atypiques, puisqu'ils possèdent deux domaines de liaison à l'ADN, plutôt qu'un seul, et n'ont pas besoin des facteurs DP pour lier l'ADN (Biswas and Johnson, 2012; Lammens et al., 2009).

Le premier rôle connu des E2F est la régulation du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN. Pour accomplir ce rôle, les E2F1-5 ont un partenaire, le suppresseur de tumeur pRB, ou un de ses homologues p107 ou p130. pRB s'associe aux E2F activateurs en masquant leur domaine de transactivation, ce qui les empêche donc d'activer la transcription de leurs cibles lorsque la cellule est en quiescence, par exemple (Biswas and Johnson, 2012). De plus, les E2F répresseurs sont surtout actifs pendant cette quiescence des cellules, ou encore pendant leur différenciation (Engelmann and Putzer, 2010; Iaquina and Lees, 2007). Lors de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, pRB est phosphorylée par les kinases Cdk associées à la cycline D, et ceci engendre un changement de conformation de ce régulateur et par conséquent, la libération du domaine de transactivation des E2F activateurs et la transcription de leurs gènes cibles, plusieurs étant impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN (Dick and Rubin, 2013; Iaquina and Lees, 2007).

Peu de temps après, d'autres rôles ont été découverts pour les facteurs E2Fs, surtout pour E2F1. Ainsi, un rôle pour E2F1 dans l'induction de l'apoptose a rapidement été exposé, et dès les premières études, il semblait clair que cette fonction était indépendante du rôle de E2F1 dans la progression du cycle cellulaire (Holmberg et al., 1998; Phillips et al., 1997). Des observations ont subséquemment montré que, tout comme pour p53, l'expression d'E2F1 était régulée à la hausse à la suite de traitements provoquant des dommages à l'ADN (Blattner et al., 1999). En ce qui concerne les autres facteurs E2Fs, les évidences montrant leur implication dans la réponse apoptotique à des dommages à l'ADN sont moins nombreuses, mais certaines existent tout de même. De ce fait, E2F3a peut être induit en réponse à la chimiothérapie, mais

son rôle principal serait surtout d'aller lui-même activer la transcription d'E2F1 (Martinez et al., 2010). Du côté des répresseurs, le niveau d'expression d'E2F4 est diminué en réponse aux dommages à l'ADN, alors que celui des E2F atypiques, E2F7 et E2F8 est augmenté (Ma et al., 2004; Zalmas et al., 2008). En fait, E2F7 et E2F8, en réponse à un stress génotoxique, peuvent lier le promoteur d'*E2F1* et réguler de façon négative son expression (Zalmas et al., 2008). Puisque la régulation et le rôle d'E2F1 sont les mieux caractérisés dans la réponse apoptotique, ce sont ceux-ci qui seront discutés dans les sections suivantes.

4.2.1 La régulation de l'activité d'E2F1 en réponse à des dommages à l'ADN

Tout comme dans le cas de p53, la régulation d'E2F1 à la suite d'un stress génotoxique se fait principalement par modifications posttraductionnelles, ainsi que par association avec divers cofacteurs. En effet, les kinases activées par les dommages à l'ADN peuvent phosphoryler E2F1, ce qui favorise la stabilité de la protéine. ATM et ATR peuvent phosphoryler E2F1 sur la sérine 31, alors que Chk1/2 phosphorylent la sérine 364 (Lin et al., 2001; Stevens et al., 2003). Une autre sérine semble être phosphorylée à la suite de certains traitements chimiothérapeutiques, la sérine 403, mais la kinase responsable de cette modification n'est pas connue (Real et al., 2010). Un des mécanismes par lesquels ces phosphorylations d'E2F1 peuvent stabiliser la protéine est illustré par la liaison de la protéine 14-3-3 τ à la sérine 31 phosphorylée par ATM /ATR, ce qui inhibe l'ubiquitination d'E2F1 et donc sa dégradation (Wang et al., 2004). La présence de 14-3-3 τ est aussi nécessaire pour l'induction des cibles proapoptotiques d'E2F1 (voir ci-dessous), ce qui confirme l'importance de la phosphorylation d'E2F1 par les kinases impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN pour réguler son rôle dans l'apoptose (Wang et al., 2004). E2F3a peut aussi être phosphorylé par Chk1/2, sur la sérine 124 (Martinez et al., 2010). Également, certaines lysines d'E2F1 sont acétylées par P/CAF (p300/CBP-associated factor) à la suite de divers stress génotoxiques, et cette acétylation permet le recrutement sélectif d'E2F1 sur les promoteurs de ses gènes cibles proapoptotiques (Ianari et al., 2004; Pediconi et al., 2003). En somme, la figure 18 présente l'effet cumulatif de ces modifications causées par les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN sur l'expression d'E2F1 et de ses gènes cibles codant pour des protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose.

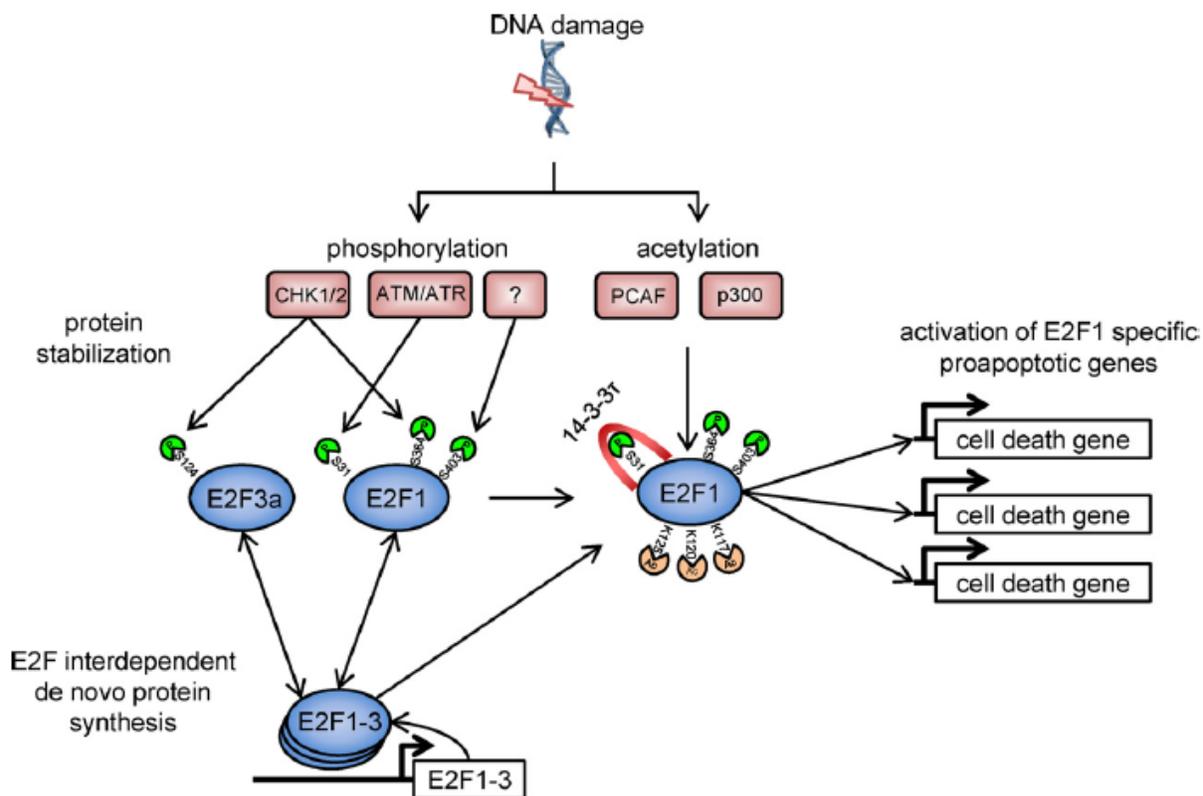


Figure 18. La régulation des facteurs activateurs de la famille E2F en réponse aux dommages à l'ADN.

Des stress génotoxiques engendrent la phosphorylation et l'acétylation de divers résidus d'E2F1 et d'E2F3a, ce qui permet de stabiliser la protéine, notamment via la liaison de la protéine 14-3-3τ. Les facteurs E2F activateurs peuvent eux-mêmes favoriser la transactivation de leurs propres promoteurs. En fin de compte, les modifications posttraductionnelles d'E2F1 permettent aussi l'activation sélective de ses cibles proapoptotiques. Tiré de (Engelmann and Putzer, 2010).

En réponse aux dommages à l'ADN, l'interaction entre E2F1 et pRB peut aussi être affectée, surtout que pRB elle-même peut être soumise à diverses modifications posttraductionnelles. Cependant, la situation n'est pas aussi bien définie que ce qui se produit lorsque des signaux de croissance favorisent la phosphorylation de pRB par les Cdk. Dans un premier temps, pRB peut s'associer à E2F1 de façon différentielle par rapport aux autres

facteurs E2F. En effet, les protéines de la famille pRB interagissent généralement avec les facteurs E2F, incluant E2F1, via leur domaine central, ou domaine *pocket*. Cependant, pRB peut aussi lier E2F1, et seulement E2F1, grâce à son domaine C-terminal (Dick and Dyson, 2003). À la suite de dommages à l'ADN, cette interaction peut être rompue en raison de l'acétylation de lysines dans le domaine C-terminal de pRB, ce qui favorise l'activité proapoptotique d'E2F1 (Dick and Dyson, 2003; Markham et al., 2006). Dans un second temps, l'action de pRB peut aussi être régulée par la phosphorylation de sa sérine 612 par Chk1/2 en réponse à des dommages à l'ADN, alors que cette sérine est habituellement phosphorylée par les Cdk (Inoue et al., 2007). Contrairement à ce que l'on pourrait croire, cette phosphorylation dans le domaine central de pRB augmente son association avec E2F1, et de cette façon, l'activité transcriptionnelle d'E2F1 est inhibée (Inoue et al., 2007). D'autres études montrent encore qu'E2F1 existe soit librement, soit en complexe avec pRB après un stress génotoxique, tout dépendant de ses modifications posttraductionnelles, et que les complexes pRB-E2F1 peuvent être transcriptionnellement actifs (Carnevale et al., 2012; Ianari et al., 2009). Effectivement, ces complexes peuvent recruter des déacétylases d'histones (HDAC) pour inhiber la transcription de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, alors qu'ils recrutent plutôt des acétylases d'histones sur les promoteurs de gènes proapoptotiques (Ianari et al., 2009). Il semble donc que l'interaction entre pRB et E2F1 soit contrôlée de façon précise en réponse aux dommages à l'ADN, probablement grâce à différentes modifications posttraductionnelles qui se produisent.

4.2.2 Les fonctions d'E2F1 dans l'apoptose

Certaines expériences ayant montré que le rôle d'E2F1 dans l'apoptose ne dépend pas de sa capacité à activer la transcription de ses gènes cibles (Bell et al., 2006; Hsieh et al., 1997), il s'avère tout de même qu'E2F1 peut favoriser l'expression de plusieurs cibles proapoptotiques, possiblement en dé-réprimant leur expression à la suite de dommages à l'ADN. Principalement, les rôles d'E2F1 dans la réponse apoptotique à un stress génotoxique se divisent en deux : l'induction de l'apoptose via l'activation de p53, puis indépendamment de p53.

4.2.2.1 Les fonctions dépendantes de p53

Les liens entre la régulation de p53 et celle d'E2F1 sont très nombreux et plusieurs moyens d'action d'E2F1 pour causer l'apoptose passent par une régulation positive de l'activité de p53, ainsi qu'une collaboration entre les deux facteurs de transcription (Polager and Ginsberg, 2009). D'abord, E2F1 stimule directement l'expression de la protéine p14^{ARF}, qui peut alors lier MDM2 et empêcher la dégradation de p53, ce qui évidemment entraîne une stabilisation de la protéine (Bates et al., 1998; Pomerantz et al., 1998). Une autre façon de stabiliser p53 est sa phosphorylation par les kinases activées par les dommages à l'ADN. Il a ainsi été montré qu'E2F1 régule la transcription d'ATM et de Chk2, ce qui permet une augmentation du niveau de phosphorylation de p53 (Berkovich and Ginsberg, 2003; Rogoff et al., 2004). Ceci constitue aussi une boucle de régulation positive pour E2F1 étant donné que ce facteur est aussi phosphorylé par les deux mêmes kinases. Enfin, E2F1 interagit directement avec p53, grâce à son domaine de liaison à la cycline A, généralement en réponse à des dommages à l'ADN, alors que les niveaux d'expression de la cycline A diminuent (Hsieh et al., 2002). Cette interaction favorise la rétention nucléaire de p53 et la transactivation de ses cibles proapoptotiques (Fogal et al., 2005a).

Pour garantir l'induction du rôle apoptotique de p53, l'expression de certains autres gènes peut aussi être régulée de façon positive par E2F1. Ainsi, les gènes codant pour les protéines ASPP1/2, qui agissent comme cofacteurs de p53 pour promouvoir l'apoptose, sont des cibles directes de E2F1 (Chen et al., 2005; Fogal et al., 2005b; Hershko et al., 2005). De plus, E2F1 contrôle l'expression de TP53INP1 (*tumor protein p53-inducible nuclear protein 1*), une protéine importante pour la phosphorylation de la sérine 46 de p53, cette étape de phosphorylation étant cruciale pour la fonction de p53 dans l'apoptose (Hershko et al., 2005; Oda et al., 2000). Cette collaboration entre E2F1 et p53 pour favoriser une réponse apoptotique est aussi démontrée par le fait que les deux facteurs de transcription peuvent stimuler l'expression de certaines des mêmes cibles proapoptotiques, comme *APAF1*, ainsi que *NOXA* et *PUMA* (Engelmann and Putzer, 2010; Polager and Ginsberg, 2009).

4.2.2.2 Les fonctions indépendantes de p53

Bien qu'E2F1 et p53 aient certains gènes cibles proapoptotiques en commun, l'expression de plusieurs autres facteurs proapoptotiques peut être affectée par E2F1 indépendamment de p53, comme la plupart des protéines BH3, membres de la famille Bcl-2, ainsi que la plupart des caspases, et l'inhibiteur des IAP SMAC/DIABLO (Engelmann and Putzer, 2010). En sus, E2F1 peut activer la transcription du gène codant pour p73, qui peut alors réguler certaines des cibles de p53 pour stimuler l'apoptose, même lorsque p53 est absent ou muté (Irwin et al., 2000; Stiewe and Putzer, 2000). Une certaine redondance entre les cibles de p53, p73 et E2F1 existe donc, ce qui peut être avantageux lorsqu'un des facteurs de transcription ne peut jouer son rôle habituel, par exemple dans un cancer où p53 est muté.

Il est également intéressant de noter qu'E2F1 peut réprimer l'expression de certaines protéines antiapoptotiques, comme Mcl-1, un membre de la famille Bcl-2, et que cette répression se fait grâce à la liaison directe d'E2F1 sur le promoteur de *MCL-1* (Croxtton et al., 2002; Ma et al., 2003). De même, E2F1 peut réprimer l'expression de GRP78/BiP (78 kDa *glucose-regulated protein/Binding immunoglobulin protein*), une protéine prosurvie impliquée dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Racek et al., 2008). L'expression de GRP78 a déjà été associée avec une résistance à des traitements génotoxiques et la capacité d'E2F1 à déplacer des facteurs de transcription activateurs Sp1 du promoteur de *GRP78* et d'en inhiber la transcription pourrait favoriser une meilleure réaction apoptotique face à ces traitements (Racek et al., 2008; Reddy et al., 2003).

4.2.3 Le rôle d'E2F1 dans la chimiorésistance

Bien que la capacité d'E2F1 d'agir en tant que suppresseur de tumeur soit bien établie, E2F1 garde toujours son rôle important dans la prolifération cellulaire. De récentes évidences montrent qu'E2F1 pourrait agir comme inhibiteur de l'apoptose en réponse à la chimiothérapie dans des tumeurs de stades avancés, ce qui peut sembler incompatible avec son rôle dans la mise en place de l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN présenté ci-dessus (Engelmann and Putzer, 2012; Putzer and Engelmann, 2013). Étant donné que pRB est souvent muté dans les cellules cancéreuses, le niveau d'activité d'E2F1 est par conséquent

dérégulé dans de nombreuses tumeurs. L'identification de la fonction proapoptotique d'E2F1 a donc pu sembler comme une bonne nouvelle pour de nombreux patients. Quelques études ont d'ailleurs montré que la présence d'E2F1 dans une tumeur a le potentiel d'agir comme marqueur prédisant un effet positif d'une chimiothérapie (Kwon et al., 2010; Lee et al., 2008). Cependant, d'autres études sont venues contredire cette conclusion. Elles montrent que la présence d'E2F1, et sa capacité d'activer la transcription de ses gènes cibles, peut être un marqueur à la fois d'une résistance à la chimiothérapie et d'une progression du cancer vers un état invasif (Han et al., 2003; Lee et al., 2010). En fait, E2F1 peut réguler l'expression de gènes impliqués dans la formation de métastases et l'invasivité d'un cancer, qui, lorsqu'il atteint ce stade plus avancé, devient souvent résistant à l'induction de l'apoptose habituellement causée par les thérapies conventionnelles (Engelmann and Putzer, 2012; Putzer and Engelmann, 2013).

Lorsque la fonction proapoptotique d'E2F1 est activée, E2F1 semble elle-même capable de réguler cette fonction de façon négative presque simultanément. Ainsi, des évidences montrent que l'acétylation d'E2F1 est nécessaire pour la spécificité du recrutement du facteur sur des promoteurs de gènes proapoptotiques en réponse à des dommages à l'ADN, mais en même temps, E2F1 peut activer la transcription de la sirtuine 1 (SIRT1), une déacétylase qui peut agir sur le niveau d'acétylation d'E2F1 (Olmos et al., 2011). De même, E2F1 peut stimuler l'expression de TopBP1, un facteur prosurvie, qui peut lui-même s'associer avec E2F1 sur des promoteurs de gènes proapoptotiques, favoriser le recrutement de protéines du complexe SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non Fermentable*) de remodelage de la chromatine et ainsi inhiber l'activité transcriptionnelle d'E2F1 (Liu et al., 2004). Il s'avère donc qu'E2F1 est capable de réguler de façon négative sa propre fonction proapoptotique.

TopBP1 peut aussi contrôler une autre fonction d'E2F1 dans la réparation de l'ADN à la suite de dommages, indépendamment de son rôle de facteur de transcription. En effet, rapidement après le stress, TopBP1 peut recruter E2F1, lorsque phosphorylée sur la sérine 31, sur les sites du dommage et favoriser la formation de complexes impliqués dans la réparation de l'ADN (Biswas and Johnson, 2012; Putzer and Engelmann, 2013). E2F1 peut donc être recruté sur des sites où des adduits se sont produits en raison d'une exposition à des rayons

UV et stimuler le recrutement de protéines impliquées dans la réparation via l'excision de nucléotide (Guo et al., 2010). De façon similaire, E2F1 peut être localisée sur des sites de bris double brin et participer au recrutement du complexe MRN (Chen et al., 2011). Également, E2F1 peut transactiver plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, comme Rad51 et BRCA1 (Putzer and Engelmann, 2013). Si l'activité d'E2F1 est dérégulée dans une tumeur de stade avancée, plutôt que d'encourager l'induction de l'apoptose quand les mécanismes proapoptotiques sont inhibés, E2F1 peut favoriser la réparation de l'ADN. Ainsi, puisque la réparation de l'ADN n'est pas un processus souhaité dans des cancers invasifs, celui-ci peut alors devenir un mécanisme de résistance à la chimiothérapie.

En somme, il est impossible de nier que la régulation de la réponse apoptotique à la suite de stress génotoxiques, surtout celle régulée par des facteurs comme p53 et E2F, est très complexe et plusieurs niveaux de régulation se côtoient, dont plusieurs ont été abordés jusqu'à maintenant. Néanmoins, un autre palier de complexité existe puisque de plus en plus d'études abordent le rôle de la régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes dans la réponse aux dommages à l'ADN et le prochain chapitre y sera consacré.

5. La régulation posttranscriptionnelle dans la réponse aux dommages à l'ADN et l'apoptose

Étant donné que les niveaux observés de protéines ne correspondent pas de façon nette au taux de transcription des ARNm correspondants, il en découle que les nombreux et variés mécanismes de régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes ont une grande importance sur le protéome d'une cellule (Mansfield and Keene, 2009). De plus en plus d'évidences montrent que ce type de régulation de l'expression génique a une portée essentielle dans la réponse aux dommages à l'ADN, en plus de nombreux autres processus cellulaires. Une étude à grande échelle montre d'ailleurs qu'en réponse à des irradiations, il y a dix fois plus de gènes affectés au niveau de l'initiation de la traduction de leur ARNm, évalué en fonction de leur association avec les polysomes, que de gènes dont c'est le niveau de transcription qui varie (Lu et al., 2006).

Une fraction considérable de ces mécanismes de régulation posttranscriptionnelle est régulée par des protéines qui lient les ARNm, ou RBP. Comme démontré par de multiples exemples dans les sections précédentes, un des processus par lesquels la réponse aux dommages à l'ADN se déploie est la modification posttraductionnelle de protéines effectrices dans la réponse. Les RBP sont elles-mêmes soumises à des modifications posttraductionnelles, comme la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitination, en réponse à divers signaux, dont des signaux de stress (Glisovic et al., 2008; Mansfield and Keene, 2009). En fait, une étude cherchant à identifier le plus de substrats possibles des kinases ATM et ATR a permis d'établir, à la surprise de ses auteurs, que de nombreuses RBP peuvent être phosphorylées par ces deux kinases essentielles dans la réponse aux dommages à l'ADN (Matsuoka et al., 2007).

Avant d'entrer dans les détails des autres évidences indiquant l'importance de la régulation posttranscriptionnelle dans la réponse au stress génotoxique, un aperçu des mécanismes et des acteurs responsables de cette régulation s'impose.

5.1 Survol de la régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes

5.1.1 Entre la transcription et la traduction

Le métabolisme, ou la « vie », d'un ARNm peut être très complexe (Moore, 2005). Pendant même que la transcription se produit, le pré-ARNm peut déjà commencer à être modifié et surtout, il s'associe à diverses RBP. Chaque ARNm possède généralement plusieurs séquences ou structures secondaires ou tertiaires en *cis* garantissant le recrutement de facteurs en *trans*, des RBP, bien sûr, mais aussi des ARN non codants, comme des microARN (miARN). Le pré-ARNm subit la pose de la coiffe en 5', la polyadénylation en 3', ainsi que l'épissage ou l'épissage alternatif (Fig. 19). L'épissage du pré-ARNm assure le recrutement de certains facteurs qui peuvent s'associer à tous les ARNm épissés, c'est-à-dire le complexe de jonction d'exons (EJC), qui représente un bon exemple de protéines associées aux ARNm pouvant dicter les étapes suivantes de son métabolisme. Ainsi, l'EJC peut favoriser l'initiation de la traduction d'un ARNm ou encore causer sa dégradation par le mécanisme de contrôle de

qualité de dégradation des ARNm non-sens (NMD) (Fig. 19) (Glisovic et al., 2008; Moore, 2005). Évidemment, de nombreuses autres RBP peuvent lier un certain ARNm, en fonction de diverses spécificités pour une séquence ou une structure particulière dans celui-ci. Ces protéines peuvent surtout réguler le destin cytoplasmique des ARNm, à la suite de leur export nucléaire, c'est-à-dire qu'elles contrôlent l'initiation ou la répression de sa traduction, sa stabilité et sa dégradation, ainsi que sa localisation dans la cellule et sa traduction localisée.

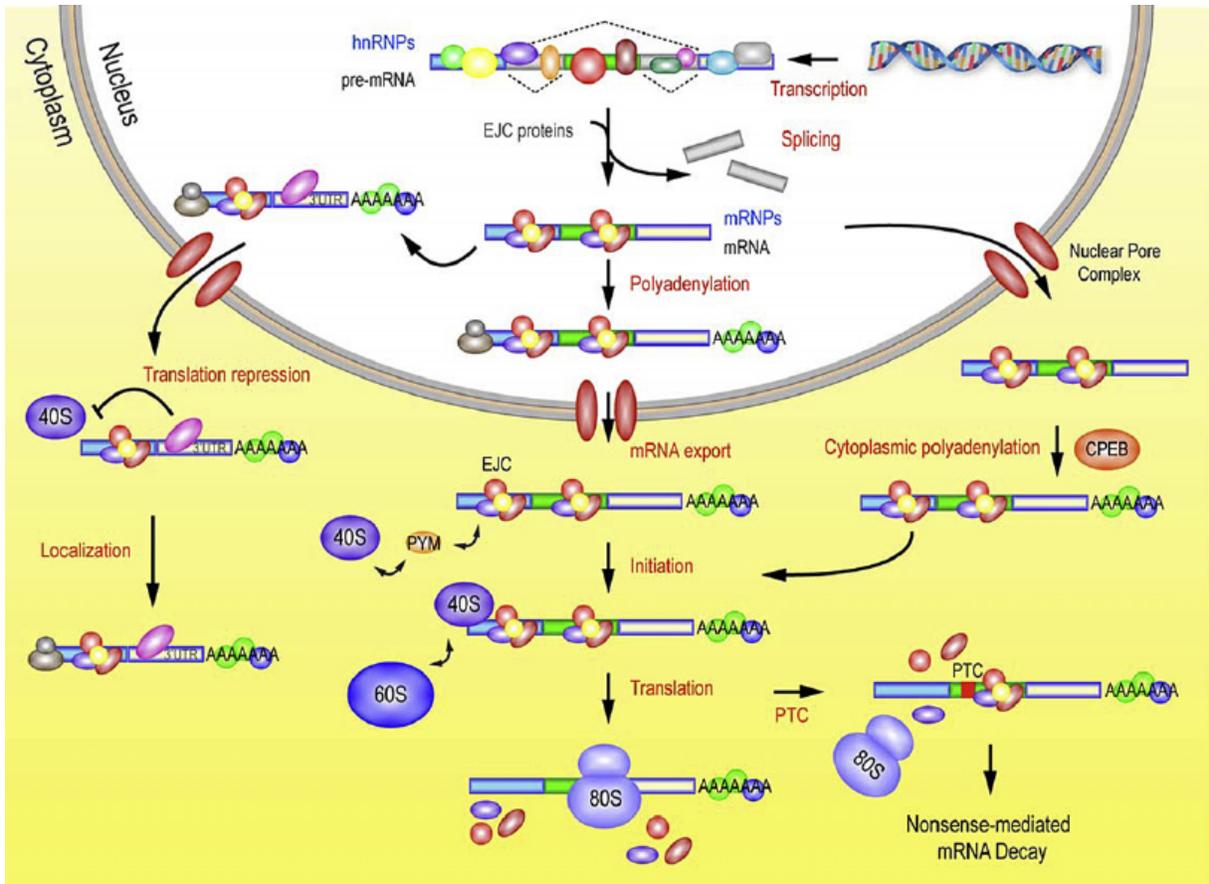


Figure 19. Les différentes étapes du métabolisme d'un ARNm entre sa transcription et sa traduction.

Après sa transcription, le pré-ARNm est épissé et polyadénylé, puis il est exporté du noyau dans le cytoplasme où il peut être soumis à divers destins : initiation de sa traduction, répression de sa traduction, localisation à un endroit précis de la cellule, modulation de sa stabilité et puis, dégradation. Tiré de (Glisovic et al., 2008).

Les facteurs interagissant avec les ARNm en *trans* sont absolument essentiels pour réguler le destin des ARNm. Les RBP sont d'ailleurs extrêmement nombreuses dans tous les organismes, et particulièrement chez les mammifères. Des études à grande échelle récentes ayant pour but d'identifier toutes les protéines interagissant avec l'ARN dans des cellules humaines ont d'ailleurs permis de montrer qu'il en existe environ 800, un nombre encore plus important que les prédictions bio-informatiques effectuées précédemment (Baltz et al., 2012; Castello et al., 2012). Certaines RBP sont impliquées dans des processus bien spécifiques dans le destin d'un ARNm, alors que d'autres ont un rôle à jouer dans plusieurs étapes. Par exemple, une protéine pourrait être impliquée autant dans la localisation d'un ARNm que dans la régulation de sa traduction pendant ou après son transport. Les RBP s'associent en général avec l'ARN via des domaines (RBD) bien définis, dont le domaine RRM, la boîte RGG, le domaine KH, le domaine Sm, la boîte DEAD/DEAH ou le domaine de liaison à l'ARN double-brin, soit le dsRBD (Glisovic et al., 2008). Une RBP peut posséder plus d'une copie d'un même RBD ou encore, des RBD différents en nombres variables. Cependant, une des études mentionnées ci-dessus a permis de mettre en lumière le fait que certaines protéines peuvent aussi interagir avec l'ARN grâce à des régions beaucoup plus désordonnées contenant des motifs d'acides aminés répétés, ce qui pourrait expliquer pourquoi ces protéines n'ont pas été identifiées lors d'analyses informatiques cherchant de nouvelles RBP contenant des RBD bien spécifiques (Castello et al., 2012).

Tel que décrit ci-dessus, les RBP sont des protéines très souvent ciblées par des modifications posttraductionnelles, la plus reconnue étant bien sûr la phosphorylation. Ces modifications peuvent moduler la liaison entre la RBP et ses ARNm cibles, ou encore modifier sa localisation intracellulaire, ou son interaction avec d'autres facteurs protéiques (Glisovic et al., 2008; Mansfield and Keene, 2009). En réponse à différents signaux, l'activité des RBP, ou leur capacité à lier l'ARN, peut donc varier, ce qui a par conséquent un effet direct sur l'expression de leurs ARNm cibles. Donc, ce type de régulation pourrait avoir un effet plus rapide sur l'expression de gènes que la transcription *de novo*, ce qui est important lorsque les signaux intégrés par la cellule demandent une réponse preste.

Certains ARN non codants, dont les miARN, peuvent aussi influencer le destin des ARNm. Les miARN sont des petits ARN simple brin d'environ 22 nucléotides qui s'associent avec les protéines Argonautes (AGO) pour former le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Les miARN s'associent de façon partiellement complémentaire au 3'UTR d'un ARNm, ce qui permet l'inhibition de sa traduction ou encore, sa dégradation. Le rôle des miARN dans pratiquement tous les processus biologiques ne fait plus de doute et certains agissent même en tant qu'oncogènes ou suppresseurs de tumeurs lors de la tumorigenèse (Iorio and Croce, 2012). Il n'est donc pas surprenant que l'expression des miARN est souvent dérégulée dans les cancers (Iorio and Croce, 2012) et que plusieurs miARN soient par le fait même impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (Chowdhury et al., 2013). En effet, l'expression des différents miARN varie de façon importante lorsque des cellules sont soumises à des stress génotoxiques et les miARN sont des composants significatifs des réponses instaurées par p53 et E2F1 lorsque des dommages à l'ADN se produisent (voir ci-dessous) (Chowdhury et al., 2013).

5.1.2 Les complexes ribonucléoprotéiques et les opérons d'ARN

Évidemment, les RBP et les miARN peuvent s'associer à plusieurs ARNm différents, et un même ARNm peut être liés par plus d'une RBP ou plus d'un miARN, ce qui fait en sorte de réguler de façon très précise le destin d'un ARNm. De cette façon, les ARNm ainsi que leurs régulateurs en *trans* sont regroupés en complexes ribonucléoprotéiques (RNP) régulant l'ARNm tout au long des étapes distinctes de son métabolisme. Divers types de complexes RNP existent, dont certains assez bien définis, comme les P-bodies et les granules de stress, impliqués surtout dans la dégradation des ARNm et dans la répression de leur traduction, respectivement (Erickson and Lykke-Andersen, 2011). L'implication des complexes RNP dans le transport et la localisation des ARNm est aussi bien établie (Marchand et al., 2012).

Dans la dernière décennie, d'innombrables études ont tenté d'identifier les ARNm qui sont liés par des RBP dans des complexes RNP. Une méthode employée régulièrement pour faire la lumière sur cette interaction entre une RBP et ses ARNm cibles est le RIP-CHIP, qui consiste en une immunoprécipitation de la RBP d'intérêt, l'isolation des ARNm présents en complexe avec celle-ci, et l'utilisation de micropuces d'ADN pour identifier ces ARNm (Furic

et al., 2008; Keene et al., 2006). Cette méthode a permis d'identifier les cibles de maintes RBP, en reconnaissant toutefois qu'une des limites principales de celle-ci est que les ARNm n'interagissent pas nécessairement de façon directe avec la RBP d'intérêt, bien qu'ils font partie du même complexe (Riley and Steitz, 2013). D'autres protocoles ont alors été développés, certains utilisant différentes techniques pour lier les ARNm à une RBP particulière de façon covalente afin de seulement récolter les ARNm qui sont directement liés à cette protéine à la suite de l'immunoprécipitation (Riley and Steitz, 2013). De plus, les techniques de séquençage de l'ARN de plus en plus perfectionnées permettent aujourd'hui de déterminer de façon assez précise quelle région ou séquence de l'ARNm s'associe avec la RBP.

Toutes ces études ayant permis d'identifier quels ARNm peuvent interagir avec des RBP spécifiques génèrent une grande quantité d'informations ayant permis le développement de la théorie des opérons d'ARN (Keene, 2007; Keene and Tenenbaum, 2002). Cette théorie stipule que des ARNm codant pour des protéines agissant dans une même voie de régulation cellulaire, ou encore se localisant à un même endroit précis dans la cellule, peuvent être régulés de manière coordonnée par une même RBP. Ceci permettrait aux cellules de répondre de façon plus vive à certains signaux, ou à des changements dans leur environnement, si l'expression de protéines impliquées dans un même processus peut être régulée de façon coordonnée au niveau des ARNm (Keene, 2007). Par conséquent, il n'est pas étonnant de constater que la réponse aux dommages à l'ADN et l'apoptose sont largement contrôlées au niveau de la régulation posttranscriptionnelle de l'expression et les diverses évidences connues actuellement seront présentées dans la section suivante.

5.2 Les dommages à l'ADN et la régulation posttranscriptionnelle de l'expression génique

La réponse aux dommages à l'ADN peut engendrer des changements dans la régulation posttranscriptionnelle à plusieurs niveaux. Ceux abordés ici seront les changements dans l'épissage alternatif des pré-ARNm, la stabilité et la traduction des ARNm, ainsi que la régulation par les miARN.

5.2.1 L'épissage alternatif

De nombreux gènes impliqués dans la cascade d'induction de l'apoptose peuvent donner des protéines soit proapoptotiques, soit antiapoptotiques. Le destin de ces protéines est décidé au niveau de l'épissage alternatif de leurs messagers. Ceci est le cas pour certaines caspases, l'inhibiteur c-FLIP, et aussi le transcrite *bcl-x*, dont la forme longue code pour une protéine antiapoptotique, alors que la forme courte donne une protéine proapoptotique. Des évidences récentes ont montré que l'activité d'E2F1 en réponse à un stress génotoxique est nécessaire pour favoriser l'épissage alternatif préférentiel des formes proapoptotiques des ARNm codant pour ces protéines, par rapport à leurs formes antiapoptotiques (Merdzhanova et al., 2008). En effet, E2F1 peut activer la transcription du facteur d'épissage SC35, membre de la famille des protéines riches en sérines et arginines (SR), qui sont des régulateurs importants de l'épissage (Merdzhanova et al., 2008). E2F1 peut donc transactiver des gènes impliqués directement dans l'apoptose, mais peut aussi favoriser la transcription de régulateurs de l'expression posttranscriptionnelle de ces facteurs apoptotiques. Le facteur d'épissage SC35 peut aussi être modifié posttraductionnellement à la suite de dommages à l'ADN. Ainsi, un traitement à la cisplatine entraîne une désacétylation de la protéine dans son domaine RRM, et sa phosphorylation, ce qui stimule l'épissage de pré-ARNm codant pour des protéines ayant un rôle dans l'apoptose (Edmond et al., 2011). Enfin, SC35 est aussi impliqué dans l'épissage alternatif du pré-ARNm codant pour l'oncogène Hras. En réponse à un traitement avec la CPT, ce pré-ARNm est épissé pour inclure un exon contenant un codon de terminaison prématuré (PTC), ce qui engendre la dégradation de cet ARNm par le NMD et permet ainsi d'éviter la production de la protéine Hras fonctionnelle (Barbier et al., 2007).

D'autres facteurs agissent dans les changements dans l'épissage alternatif causés par divers stress, comme la vitesse de l'élongation de la transcription (Montes et al., 2012; Munoz et al., 2009). Par exemple, les rayons UV causent une hyperphosphorylation du domaine carboxyterminal (CTD) de l'ARN polymérase II et du fait même, une inhibition de l'élongation, ce qui modifie l'épissage alternatif du pré-ARNm *bcl-x* et est nécessaire pour que l'apoptose se produise (Munoz et al., 2009). Aussi, des évidences montrent que certaines protéines faisant partie de l'EJC, comme Y14 et eIF4A3, peuvent avoir un rôle à jouer dans le

choix de l'épissage préférentiel de la forme antiapoptotique versus la forme proapoptotique, étant donné que la déplétion de ces protéines engendre la production de la forme épissée proapoptotique du gène *Bcl-x* (Michelle et al., 2012). Il est aussi intéressant de noter qu'il pourrait y avoir un lien encore plus direct entre l'épissage des ARNm et la réparation de l'ADN à la suite d'un stress génotoxique. Il semble que la présence de protéines liant l'ARN soit de plus en plus remarquée sur des sites de dommages à l'ADN, et c'est effectivement le cas pour le facteur d'épissage RBMX, qui joue un rôle important dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologe (Adamson et al., 2012). Des études subséquentes pourront sûrement apporter un plus grand éclairage sur la fonction des RBP interagissant avec des sites où se trouvent des bris dans l'ADN.

Un des exemples les plus importants du rôle que l'épissage alternatif peut avoir en réponse à des stress génotoxiques est probablement celui de Mdm2. Bien que l'expression et la fonction de Mdm2 soient déjà régulées à divers niveaux en réponse à un stress, comme des modifications posttraductionnelles, elles peuvent aussi être affectées par l'épissage de son pré-ARNm. En effet, en réponse à divers stress génotoxiques, des sauts d'exons se produisent lors de l'épissage du pré-ARNm codant pour Mdm2, alors que seulement la protéine pleine longueur est active pour inhiber p53 (Chandler et al., 2006; Dias et al., 2006; Dutertre et al., 2010). Cet événement d'épissage alternatif se produit grâce à l'abolition de l'interaction entre la protéine EWS, un facteur associé à l'ARN polymérase II, et YB-1, une protéine associée au spliceosome, et a pour conséquence de protéger p53 de la dégradation en diminuant la quantité de Mdm2 pleine longueur dans la cellule (Dutertre et al., 2010). L'expression de p53 peut aussi être modulée au niveau posttranscriptionnel à l'aide d'un autre mécanisme de maturation des ARNm. À la suite de la transcription, la grande majorité des ARNm doivent subir le processus de clivage de l'extrémité 3' et la polyadénylation à cette extrémité. Cependant, cette étape est souvent inhibée à la suite de dommages à l'ADN, mais une structure G-quadruplex à l'extrémité 3' du pré-ARNm codant pour p53 assure l'interaction avec le facteur hnRNP H/F et donc, la maturation et l'ajout de la queue poly-A, ce qui permet à p53 d'être exprimée de façon optimale en situation de stress (Decorsiere et al., 2011).

5.2.2 La régulation de la stabilité des ARNm et de leur traduction

À la suite des étapes de maturation des ARNm dans le noyau, ceux-ci sont exportés dans le cytoplasme, où leur stabilité et leur traduction sont contrôlées de façon très précise, en général par des RBP diverses. C'est exactement ce qui se produit dans la réponse aux dommages à l'ADN également, où la stabilité des ARNm est mise en jeu dès leur export du noyau. En fait, l'export nucléaire de certains ARNm peut lui-même être affecté par l'activation des cascades de signalisation en réponse aux dommages. Une étude a ainsi montré que la phosphorylation par ATM de la protéine THOC5, impliquée dans l'export nucléaire, empêche la formation d'un complexe entre THOC5 et ses ARNm cibles, qui ne peuvent alors être exportés dans le cytoplasme (Ramachandran et al., 2011). Comme les ARNm dépendant de THOC5 pour leur export codent en grande partie pour des protéines impliquées dans la différenciation cellulaire, la régulation de leur export en réponse à des dommages pourrait empêcher la différenciation des cellules pendant cette situation de stress (Ramachandran et al., 2011). Un autre lien entre l'export nucléaire et l'expression subséquente des ARNm a été présenté dans une étude montrant l'interaction entre la nucléoporeine Nup98 et le 3'UTR de *p21*, cette interaction protégeant l'ARNm *p21* de la dégradation via l'exosome (Singer et al., 2012). Cette stabilisation de *p21* par Nup98 favorise donc l'entrée de la cellule en sénescence à la suite de l'activation de *p53*, et l'expression de Nup98 doit être inhibée afin de favoriser l'apoptose (Singer et al., 2012).

Les ARNm de *p53* et de *p21* sont soumis à de nombreux contrôles posttranscriptionnels et peuvent s'associer à plusieurs RBP. Une des plus importantes est la protéine HuR (*human antigen R*), dont la fonction antiapoptotique a été constatée à maintes reprises. HuR fait partie de la famille des protéines RBP ELAV, et interagit avec les ARNm grâce à des séquences riches en AU (ARE). Il a donc été montré que HuR peut lier le 3'UTR de l'ARNm de *p53* via des ARE et ainsi stimuler sa traduction pour augmenter le niveau d'expression de la protéine en réponse à un traitement aux UV (Mazan-Mamczarz et al., 2003). Une interaction existe aussi entre HuR et l'ARNm de *p21* et permet sa stabilisation à la suite d'un même traitement (Wang et al., 2000). Ce processus est régulé par la phosphorylation de HuR par la kinase *p38* MAPK, qui est activée en réponse à des dommages

à l'ADN causés, par exemple, par des irradiations (Lafarga et al., 2009). D'un autre côté, l'expression de p21 peut aussi être favorisée en réponse à des rayons UV en raison de la diminution de l'interaction de l'ARNm de p21 avec la protéine AUF1 (*AU-rich element RNA-binding protein 1*) AUF1 s'associe aussi avec des ARE dans le 3'UTR de *p21*, mais est quant à elle responsable de sa dégradation (Lal et al., 2004). HuR et AUF1 peuvent d'ailleurs entrer en compétition pour s'associer aux mêmes ARE sur l'ARNm de p21, mais peuvent aussi se lier individuellement à des sites différents (Lal et al., 2004).

L'augmentation de l'expression de p21 mène en général à un arrêt de la prolifération cellulaire, plutôt qu'à l'apoptose, et HuR stimule aussi la stabilisation ou la traduction d'autres ARNm codant pour des protéines antiapoptotiques comme SIRT1 (Abdelmohsen et al., 2007), Bcl-2 (Ishimaru et al., 2009), XIAP (Durie et al., 2011) et prothymosin α , un inhibiteur de l'apoptosome (Lal et al., 2005). On peut par conséquent considérer HuR comme le régulateur d'un opéron d'ARN antiapoptotique. Néanmoins, tel que mentionné ci-dessus, la fonction de HuR peut être modulée grâce à des modifications posttraductionnelles, surtout via phosphorylation par des kinases induites par des dommages à l'ADN. Dans ce sens, il a été observé qu'en réponse à un stress oxydatif, Chk2 peut phosphoryler HuR, et que cette phosphorylation diminue l'interaction entre HuR et l'ARNm SIRT1, qui est alors dégradé, ce qui entraîne une diminution de la survie cellulaire (Abdelmohsen et al., 2007). De plus, une étude récente montre qu'en réplique à un stress létal, HuR est clivé en début d'apoptose, bien que les deux produits de clivage puissent toujours lier l'ARN. Cependant, ces produits de clivage vont s'associer de préférence avec des ARNm codant pour des protéines proapoptotiques, comme la caspase 9, plutôt qu'aux cibles antiapoptotiques habituelles de HuR (von Roretz et al., 2013). Différents mécanismes semblent donc exister pour réguler la fonction de HuR en réponse à des stress cytotoxiques.

Une autre protéine importante qui est régulée de façon positive à la suite de divers stress est la protéine *growth arrest and DNA damage-inducible 45 α* (Gadd45 α). Elle semble avoir plusieurs rôles plus ou moins bien définis dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose en réponse à des dommages (Boucas et al., 2012; Zhan, 2005). p53 peut activer la transcription de *Gadd45 α* , mais son ARNm est aussi soumis à certains contrôles

posttranscriptionnels (Boucas et al., 2012; Zhan, 2005). Un des rôles bien documentés de Gadd45 α est son implication dans l'arrêt de la prolifération cellulaire en phase G₂, donc avant que la mitose ne soit enclenchée, en réponse à divers stress (Zhan, 2005). Dans des conditions normales, les RBP AUF1 et TIAR (*TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1*) peuvent s'associer au 3'UTR de l'ARNm *gadd45 α* , AUF1 favorisant sa dégradation et TIAR, l'inhibition de sa traduction (Lal et al., 2006). Toutefois, à la suite d'un stress génotoxique, AUF et TIAR sont relâchées de l'ARNm, la libération de TIAR étant probablement due à sa phosphorylation par p38 MAPK (Lal et al., 2006; Reinhardt et al., 2010). Cette dernière étude a aussi permis de montrer que la kinase MAPKAP 2 (MK2), activée elle-même par phosphorylation via p38, phosphoryle la RBP hnRNPA0, qui stabilise alors l'ARNm codant pour Gadd45 α (Reinhardt et al., 2010). En conséquence, le point de contrôle G₂/M est maintenu et l'arrêt de division cellulaire est prolongé afin que la cellule n'entre pas en mitose catastrophique alors que les dommages ne sont pas réparés (Reinhardt et al., 2010).

Tel que présenté dans les sections précédentes, p53 peut activer la transcription de plusieurs gènes essentiels dans la réponse aux dommages à l'ADN, dont des gènes codant pour des protéines engagées dans sa propre autorégulation, comme Mdm2. Il en est de même pour la RBP RNPC1 (ou RBM38), dont le gène est transcriptionnellement activé par p53. Ainsi, RNPC1 s'associe avec l'ARNm *p53* et peut inhiber sa traduction dans certains cancers (Zhang et al., 2011a). De même, RNPC1 affecte la stabilité des ARNm codant pour p63 (Zhang et al., 2010), p73 (Yan et al., 2012), et de Mdm2 (Xu et al., 2013). RNPC1 est aussi impliqué dans la stabilisation de l'ARNm *p21*, ce qui se ferait grâce à l'interaction directe entre RNPC1 et HuR (Cho et al., 2010). Le lien entre les deux protéines ne s'arrête pas là, étant donné que RNPC1 peut même stabiliser l'ARNm codant pour HuR en se liant à son 3'UTR (Cho et al., 2012b). Il ne semble donc faire aucun doute que la RBP RNPC1 joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération cellulaire et/ou de l'apoptose grâce à sa capacité de réguler l'expression de tous ces facteurs importants pour la mise en place d'une réponse appropriée au stress. Également, p53 peut activer l'expression d'une autre RBP, PCBP4 (*Poly(rC)-binding protein 4*), qui reconnaît des régions poly(C) dans l'ARN. Dans ce

cas, les dommages à l'ADN engendrent la liaison de PCBP4 au 3'UTR de *p21* ainsi qu'une diminution de sa stabilité (Scoumanne et al., 2011).

Enfin, puisque la traduction générale est souvent inhibée en situation de stress, certains mécanismes se sont développés afin de contourner cette inhibition afin que des protéines ayant un rôle essentiel dans la réponse aux dommages à l'ADN, comme p53, puissent tout de même être exprimées. D'un côté, en réponse à un traitement avec l'agent génotoxique étoposide, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E interagit avec sa protéine inhibitrice 4E-BP1, ce qui a pour conséquence d'inhiber le processus de traduction dépendante de la coiffe. Néanmoins, p53 possède un IRES (*internal ribosomal entry site*) dans son 5'UTR, ce qui fait en sorte que sa traduction n'est pas nécessairement dépendante de la coiffe de l'ARNm et peut se produire tout de même, malgré le stress causé par l'étoposide (Yang et al., 2006). D'un autre côté, les RBP RPL26 et nucléoline (NCL) peuvent interagir avec l'ARNm de p53 et ont des effets opposés sur sa traduction (Takagi et al., 2005). RPL26 stimule la traduction de p53 en augmentant l'association de son ARNm avec les polysomes lourds et favorise par conséquent l'apoptose causée par des irradiations, alors que NCL a l'effet contraire (Takagi et al., 2005). L'interaction de RPL26 et NCL avec l'ARNm de p53 se fait de façon plutôt inusitée, puisqu'elle nécessite la formation d'une région double brin entre une séquence du 5'UTR de l'ARNm et une séquence de son 3'UTR (Chen and Kastan, 2010). Aussi, RPL26 et NCL interagissent ensemble et il est possible que la transition entre la liaison de NCL sur cette région double brin vers la liaison de RPL26 soit l'événement qui favorise la traduction de p53 en réponse à des dommages (Chen et al., 2012).

Dans certains cas de cancer, l'expression du facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 est plus élevée que dans les cellules normales. Une étude récente a montré qu'en réponse à des irradiations, eIF4G1 dirige la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm responsable de la survie cellulaire et de la résistance à l'apoptose, comme survivine et XIAP (Badura et al., 2012). Dans certains autres cancers, c'est la RBP CUG-BP1 qui est surexprimée, et elle aussi peut soutenir l'expression de survivine afin d'éviter la mort cellulaire (Chang et al., 2012). Ces deux études montrent aussi que la déplétion de ces deux RBP dans les cellules cancéreuses où elles sont surexprimées fait en sorte de sensibiliser

celles-ci aux traitements génotoxiques (Badura et al., 2012; Chang et al., 2012). Ces observations indiquent donc que la modulation de l'expression de certaines RBP pourrait constituer une façon innovatrice de sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie.

5.2.3 Les miARN dans la réponse aux dommages à l'ADN

Étant donné que les prédictions les plus récentes avancent qu'au moins 60% des ARNm sont des cibles des miARN (Friedman et al., 2009), il n'est pas étonnant que plusieurs ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'apoptose, comme ATM, BRCA1, p53, p21, E2F et Bcl-2 soient eux-mêmes des cibles de ces petits ARN non-codants (pour une liste, consulter (Wan et al., 2011)). La réponse aux dommages à l'ADN elle-même est capable d'altérer l'expression de plusieurs miARN différents, comme le montre une étude à grande échelle récente (Simone et al., 2009). Elle le fait principalement de deux façons : en régulant leur expression au niveau de leur transcription, ou encore au niveau de leur maturation (Wan et al., 2011). Les différentes étapes de la maturation d'un miARN après sa transcription sont présentées à la figure 20a. De plus, Ago2 est relocalisée dans des granules de stress à la suite d'une exposition des cellules aux UV, ce qui pourrait favoriser l'inhibition de la traduction d'ARNm cibles de miARN en réponse à des stress génotoxiques (Pothof et al., 2009).

Au niveau de la transcription des miARN en réponse à un stress génotoxique, p53 est bien sûr impliquée, comme elle l'est dans pratiquement toutes les étapes de la réponse aux dommages à l'ADN. Les miARN dont la transcription est régulée par p53 les plus connus sont sans doute ceux de la famille miR-34 (34a, 34b et 34c) et ce sont eux qui ont d'abord été identifiés (Fig. 20b) (He et al., 2007). De nombreuses études ont alors montré le rôle des trois miARN de la famille miR-34, qui sont parfois sous-exprimés dans certains cancers, dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose initiés par p53 (Chang et al., 2007; Corney et al., 2007; He et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007; Tarasov et al., 2007). En particulier, miR-34a inhibe l'expression de SIRT1, désacétylase qui empêche p53 de jouer son rôle de promoteur de l'apoptose (Yamakuchi and Lowenstein, 2009).

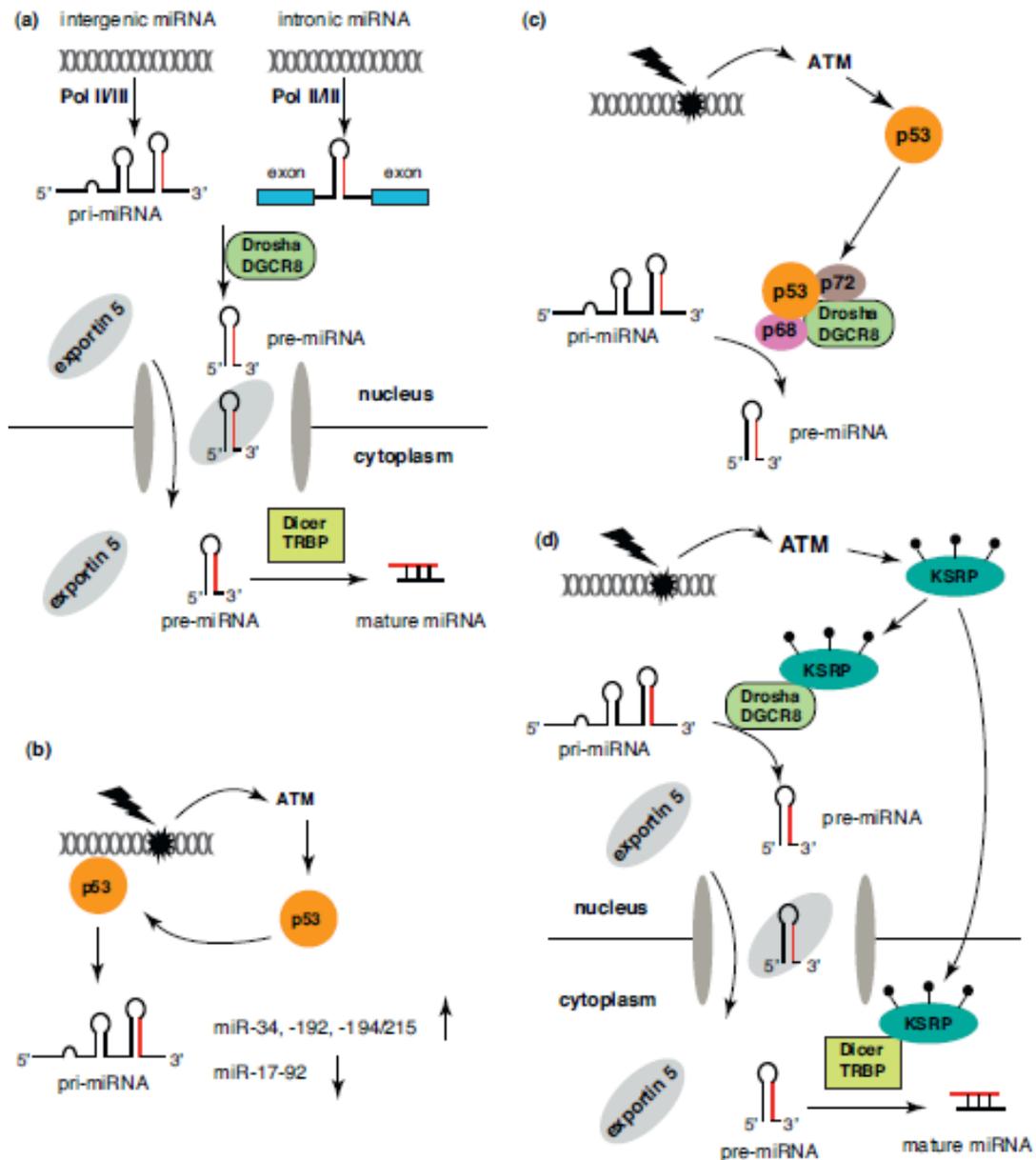


Figure 20. Les miARN dans la réponse aux dommages à l'ADN.

a) Biogenèse et maturation des miARN dans des conditions normales. b) Modulation de la transcription de certains miARN en réponse à des dommages à l'ADN. c) Implication de p53 dans la maturation des pri-miARN en pré-miARN. d) Implication de la RBP KSRP, phosphorylée par ATM, dans la maturation des miARN par les complexes Drosha et Dicer. Tiré de (Wan et al., 2011).

Tout aussi importants que la régulation des miARN au niveau de leur transcription, divers mécanismes existent afin de réguler certaines étapes de leur maturation posttranscriptionnelle en réponse à des bris dans l'ADN. Sans surprise, p53 est elle-même impliquée dans un de ces mécanismes (Suzuki et al., 2009). En fait, p53 peut interagir avec le complexe Drosha, dont le rôle est de cliver les pri-miARN en pré-miARN, grâce à son interaction avec les hélicases d'ARN p68 et p72, ce qui facilite cette étape de maturation (Fig. 20c) (Suzuki et al., 2009). Aussi, la protéine BRCA1, normalement impliquée dans la réparation de l'ADN, peut aussi faire partie de ce complexe, lier les pri-miARN et jouer un rôle dans la maturation des miARN (Kawai and Amano, 2012). Cet exemple semble donc signaler que des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN ne sont pas contraintes à une fonction unique, mais peuvent plutôt jouer des rôles multiples afin de diriger une réponse la plus robuste possible.

En plus du complexe Drosha, qui agit dans le noyau avant l'export nucléaire des pré-miARN, la maturation des miARN nécessite l'action du complexe Dicer, qui clive les pré-miARN en miARN matures. Une autre protéine qui interagit avec ces deux complexes et qui est importante pour la maturation d'un sous-ensemble de miARN est KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*), une RBP qui s'associe habituellement à des ARE sur ses ARNm cibles et stimule leur dégradation (Trabucchi et al., 2009). KSRP peut s'associer avec les miARN précurseurs et cette interaction est favorisée en réponse à un stress génotoxique (Zhang et al., 2011b). Elle est en fait contrôlée via la phosphorylation de KSRP par ATM, ce qui augmente alors l'activité de KSRP dans la maturation des miARN (Zhang et al., 2011b). De cette façon, cette étude a permis de montrer qu'ATM peut stimuler la biogenèse d'environ un quart des miARN, et par conséquent, ceci indique que les miARN doivent jouer un rôle prédominant dans la cellule afin de contrôler ce qui se produit en réponse à des dommages à l'ADN (Zhang et al., 2011b).

Dans les dernières années, de plus en plus d'ARN non-codants autres que les miARN ont été caractérisés, et certains d'entre eux semblent avoir un rôle à jouer dans la réponse à un stress. Par exemple, p53 peut activer la transcription de plusieurs longs ARN non-codants intergénomiques (lincARN) (Huarte et al., 2010). Un d'entre eux, *lincARN-p21*, interagit avec la

protéine hnRNP-K, et dirige la répression transcriptionnelle de certains gènes afin de promouvoir l'apoptose (Huarte et al., 2010). En fait, ce processus pourrait constituer un mécanisme inédit pour expliquer comment p53 peut réprimer la transcription, en plus de l'activer, en s'associant directement avec l'ADN. Un autre long ARN non-codant (lncARN) induit en réponse à des dommages à l'ADN est *gadd7* (Liu et al., 2012). Le stress causé par le rayonnement UV favorise aussi l'interaction entre *gadd7* et la protéine *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43), ce qui a comme conséquence d'atténuer l'interaction entre TDP-43 et l'ARNm codant pour Cdk6 (Liu et al., 2012). Ainsi, l'ARNm *cdk6* n'est plus protégé par TDP-43 et est dégradé, ce qui consolide la mise en place du point de contrôle G₁/S activé en réponse aux dommages à l'ADN (Liu et al., 2012).

En somme, bien que la régulation de l'expression des gènes au niveau de la transcription et à l'aide de modifications posttraductionnelles en réponse à des stress génotoxiques soit reconnue depuis un certain temps, il est clair que la découverte d'un grand nombre de mécanismes de régulation posttranscriptionnelle impliqués dans cette réponse indique qu'il existe une diversité considérable de moyens pour la cellule de répondre de façon appropriée au stress.

6. Staufen1 et Staufen2 : des protéines multifonctionnelles

Deux RBP dont l'implication dans la réponse au stress génotoxique n'a pas encore été étudiée sont les protéines Staufen1 (Stau1) et Staufen2 (Stau2), qui ont des fonctions variées et bien documentées dans différents processus de régulation posttranscriptionnelle de l'expression. Staufen a d'abord été étudiée chez la drosophile, donc le rôle de la protéine chez cet organisme sera abordé avant de présenter plus en détail ses caractéristiques et ses rôles divers chez les mammifères.

6.1 La découverte et les rôles de Staufen chez la drosophile

Staufen a d'abord été identifiée chez la drosophile dans les années 1980, lorsqu'il a été découvert que la mutation du gène *Stau* affectait le développement embryonnaire de la mouche (Schupbach and Wieschaus, 1986). Il a alors été montré que Stau était en fait

impliquée dans la localisation de certains ARNm dans l'œuf pendant l'ovogenèse. Ainsi, Stau assure en grande partie le transport et l'ancrage de l'ARNm *bicoid* au pôle antérieur de l'œuf et de l'ARNm *oskar* à son pôle postérieur (St Johnston et al., 1991). Ceci peut se faire grâce à la présence de cinq dsRBD dans la protéine Staufen de drosophile (dStau), ce qui lui permet de s'associer à des tiges-boucles dans trois régions du 3'UTR de *bicoid*, liaison nécessaire à la localisation de cet ARNm (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1992). De plus, ce transport d'ARNm par Staufen est dépendant des microtubules (Ferrandon et al., 1994; Micklem et al., 2000). De la même façon, dStau peut s'associer au 3'UTR de l'ARNm *prospero* dans les neuroblastes lors du développement de la drosophile, et cette interaction permet la localisation asymétrique de Prospero lors de la division des neuroblastes afin de produire des cellules-mères ganglionnaires (Broadus et al., 1998; Li et al., 1997).

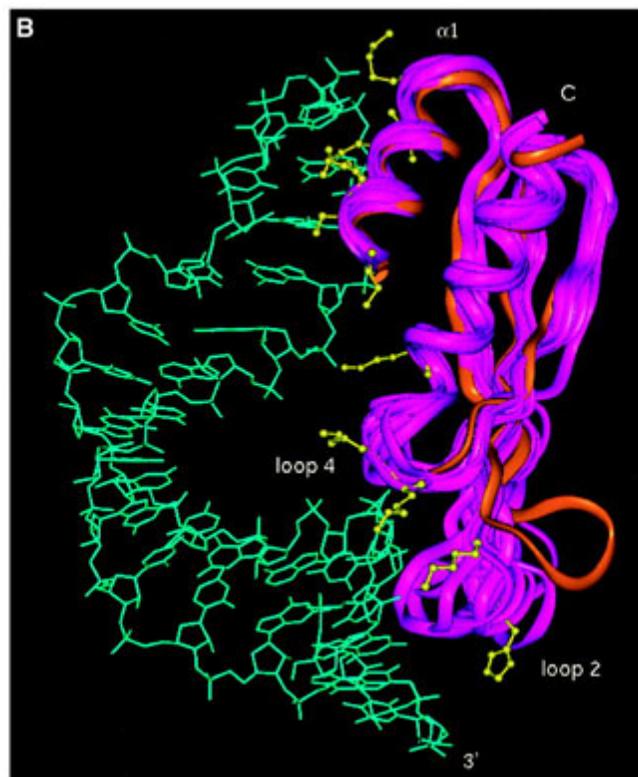


Figure 21. Structure du complexe entre le dsRBD3 de dStau et une tige-boucle de 12 paires de bases obtenue par RMN à haute résolution.

La boucle 2 (loop 2) de dStau interagit avec le sillon mineur de la tige-boucle de forme A, alors que la boucle 4 (loop 4) s'associe avec le squelette ribose-phosphate du sillon majeur. Quant à elle, l'hélice $\alpha 1$ interagit avec la boucle simple brin. Tiré de (Ramos et al., 2000).

Bien que dStau possède cinq dsRBD, ils ne peuvent pas tous s'associer à l'ARN, cette activité étant réservée aux dsRBD 1, 3 et 4 (en ordre en fonction de la séquence N- à C-terminale de la protéine) (Micklem et al., 2000; St Johnston et al., 1992). Les dsRBD 2 et 5 ne sont pas complets et seraient plutôt impliqués dans d'autres fonctions, telles que l'association aux microtubules pendant le transport ou la dé-répression de la traduction, respectivement (Micklem et al., 2000). En effet, en plus de réguler la localisation de l'ARNm *oskar*, dStau a un rôle à jouer dans la dé-répression de sa traduction à la suite de son transport, les ARNm étant traductionnellement inactifs pendant le transport (Micklem et al., 2000). En fait, le dsRBD3 de dStau est celui qui s'associe le plus fortement à l'ARN et sa mutation entrave la localisation de *bicoid* et d'*oskar* (Ramos et al., 2000). La structure du dsRBD3 de dStau en association avec une tige-boucle a été étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et est présentée à la figure 21. La résolution de cette structure a permis de montrer que dStau interagit particulièrement avec le squelette ribose-phosphate de l'ARN (Ramos et al., 2000). La question se pose alors, quels sont les déterminants de la spécificité de l'interaction entre le dsRBD3 de Stau et ses ARNm cibles? Dans l'étude de cette structure entre le dsRBD3 et une tige-boucle synthétique de 12 paires de bases, l'hélice $\alpha 1$ du dsRBD semble interagir avec la séquence simple brin de la boucle, ce qui pourrait faire en sorte de moduler la spécificité de l'interaction (Ramos et al., 2000).

6.2 Caractérisation de Stau1 et Stau2 chez les mammifères

Pour tenter d'élucider le transport d'ARN chez les mammifères, un homologue pour dStau a été recherché. En fin de compte, deux paralogues ont été identifiés. Le gène codant pour la protéine identifiée Stau1 a été trouvé sur le chromosome 20q13.1, alors que le gène codant pour Stau2 a été repéré sur le chromosome 8q13-q21.1 (Buchner et al., 1999; DesGroseillers and Lemieux, 1996).

Stau1 et Stau2 possèdent chacune quatre dsRBD, comparativement aux cinq de dStau. Stau1 contient les dsRBD correspondant aux dsRBD 2 à 5 de dStau, et ils sont donc nommés ainsi, alors que Stau2 possède les dsRBD similaires aux dsRBD 1 à 4 de dStau (Duchaine et al., 2002; Marion et al., 1999; Tang et al., 2001; Wickham et al., 1999). L'épissage alternatif

permet l'expression de trois isoformes différents de Stau1. L'isoforme le mieux exprimé encode une protéine de 55 kiloDaltons (kDa), nommé Stau1⁵⁵ (Wickham et al., 1999). Un deuxième isoforme diffère du premier par une extrémité N-terminale un peu plus longue, ce qui lui confère une taille de 63 kDa (Wickham et al., 1999). Stau1⁵⁵ et Stau1⁶³ sont représentés à la figure 22. Tel que pour dStau, ce sont les dsRBD3 et 4 seulement qui sont capables de lier l'ARN, le dsRBD3 étant le domaine majeur de liaison (Wickham et al., 1999). Il n'est donc pas surprenant que le troisième isoforme de Stau1, appelé Stau1ⁱ, soit moins apte à lier l'ARN, puisqu'il contient une insertion de 6 acides aminés dans le dsRBD3, ce qui en modifie la conformation (Brizard et al., 2000; Duchaine et al., 2000; Fa-Hui et al., 2008; Monshausen et al., 2001). En ce qui concerne Stau2, l'épissage alternatif assure l'expression de quatre isoformes de poids moléculaires différents, qui diffèrent à leur extrémité N- ou C-terminale: Stau2⁵², Stau2⁵⁶, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² (les nombres en exposant représentant leur taille en kDa) (Duchaine et al., 2002; Monshausen et al., 2004). Les quatre isoformes de Stau2 sont aussi représentés à la figure 22.

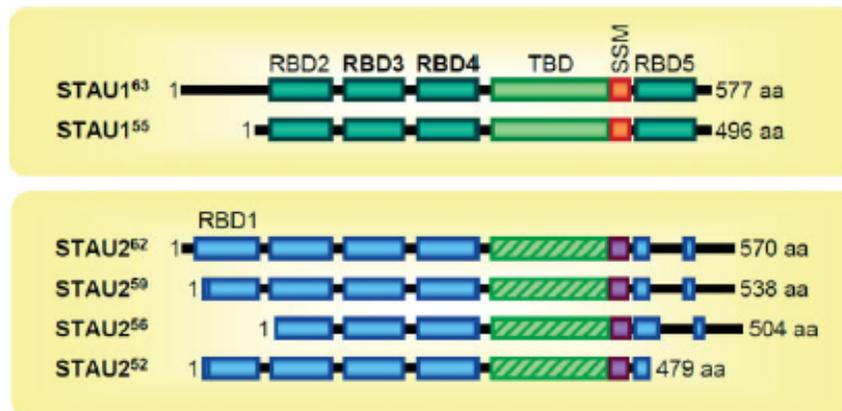


Figure 22. Représentation schématisée des différents isoformes de Stau1 et Stau2.

Les dsRBD de Stau1 sont représentés en vert foncé, alors que les dsRBD de Stau2 sont en bleu. En vert pâle ou en vert hachuré se trouvent les domaines de liaison à la tubuline (TBD) des différents isoformes, alors qu'en orange ou en mauve sont représentés les SSM ou *Staufen-Swapping Motifs*, qui permettent à Stau1 et à Stau2 d'homo- ou d'hétéro-dimériser. Tiré de (Park and Maquat, 2013).

Une distinction à faire entre dStaufen et Stau1/Stau2 est la présence dans ces deux paralogues d'une séquence similaire au domaine de la liaison à la tubuline de la protéine MAP-1B, nommée TBP pour *tubuline-binding domain* (Wickham et al., 1999). Stau1 et Stau2 sont d'ailleurs souvent retrouvés en colocalisation avec les microtubules, particulièrement dans les dendrites des neurones (Duchaine et al., 2002; Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999; Monshausen et al., 2001; Tang et al., 2001). De même, les deux protéines peuvent interagir avec la tubuline et divers autres éléments du cytosquelette et aussi certains moteurs moléculaires qui sont impliqués dans le transport le long du cytosquelette, comme la kinésine (Brendel et al., 2004; Jeong et al., 2007; Maher-Laporte et al., 2010; Ohashi et al., 2002; Villace et al., 2004). De plus, Stau1 et Stau2 font partie de complexes protéiques contenant de l'ARN et capables de se mouvoir dans les dendrites en suivant les microtubules (Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999). Ces caractéristiques font de Stau1 et Stau2 des candidates idéales pour être impliquées dans le transport d'ARNm aussi dans les cellules de mammifères, rôle qui sera abordé un peu plus loin. Il est cependant important de noter que Stau1 et Stau2 ne semblent pas faire partie des mêmes particules *in vivo* (Duchaine et al., 2002; Thomas et al., 2005), et par conséquent, il est fort probable que les deux protéines jouent des rôles parfois différents, bien qu'elles aient beaucoup en commun.

Un autre attribut de Stau1 et Stau2 est leur capacité à s'associer avec le réticulum endoplasmique rugueux (RER), les ribosomes et les polysomes, ce qui a été montré à de nombreuses reprises (Brendel et al., 2004; Duchaine et al., 2002; Luo et al., 2002; Mallardo et al., 2003; Marion et al., 1999; Ohashi et al., 2002; Thomas et al., 2009; Thomas et al., 2005; Villace et al., 2004; Wickham et al., 1999). De façon plus précise, l'association entre Stau1 et le ribosome dépend de son dsRBD4 et du TBD, ce qui permet une interaction protéine-protéine, mais l'ARN semble aussi jouer un rôle dans cette association, puisque l'activité de liaison de l'ARN du dsRBD3 est nécessaire pour assurer une interaction optimale (Luo et al., 2002). Il semble donc que Stau1 et Stau2, via leur interaction avec le RER, les ribosomes et les polysomes, puissent jouer un rôle dans la régulation de la traduction de leurs ARNm cibles, rôle qui sera aussi abordé ci-dessous. Les deux paralogues peuvent aussi faire partie d'un complexe RNP qui se forme afin d'inhiber la traduction en réponse à un stress, les granules de stress (Thomas et al., 2009; Thomas et al., 2005). Les granules de stress contiennent diverses

RBP dont HuR et TIAR, ainsi que la petite sous-unité ribosomique, et peuvent bloquer la traduction au niveau de son initiation. En fait, il a été montré que la déplétion de Stau1 facilite la formation de ces granules en réponse à un stress, alors que la surexpression de Stau1 stabilise les polysomes afin qu'ils demeurent intacts face à ce stress (Thomas et al., 2009).

Stau1 et Stau2 peuvent aussi transiter par le noyau. Il a ainsi été montré que Stau1 peut interagir avec l'ARN de la télomérase (hTR) dans le nucléole, ce qui pourrait favoriser la maturation, l'assemblage ou la localisation de hTR (Bachand et al., 2001; Le et al., 2000). Un signal de localisation nucléaire (NLS) a d'ailleurs été identifié à l'extrémité C-terminale du dsRBD3 de Stau1, ce qui permet sa localisation dans le nucléole (Martel et al., 2006). Quant à Stau2, il a été montré qu'elle peut interagir dans le noyau avec la protéine du pore nucléaire p62, avec Tap, impliquée dans l'export de l'ARN et avec deux protéines de l'EJC, Y14 et Mago (Monshausen et al., 2004). Il est intéressant de remarquer que les différents isoformes de Stau2 ne sont pas nécessairement exportés du noyau par le même mécanisme. Effectivement, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² peuvent toutes deux être exportées par l'exportine-5, l'exportine-5 étant capable d'interagir avec le dsRBD3, mais seule Stau2⁵⁹ peut être exportée par Crm1, étant donné que l'épissage alternatif de cet isoforme crée un signal d'export nucléaire (NES) à son extrémité N-terminale (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004). Au final, Stau1 et Stau2 ne s'observent pas facilement au noyau sauf de façon transitoire, alors que leur localisation principale se trouve dans le cytoplasme, associées au RER (Duchaine et al., 2002; Wickham et al., 1999). Néanmoins, la régulation de la formation de divers RNP dans le noyau par Stau1 et /ou Stau2 est une possibilité intéressante (Martel et al., 2006).

6.3 L'interaction de Stau1 et de Stau2 avec leurs ARNm cibles

Il n'est pas évident de déterminer comment Stau1 et Stau2 reconnaissent les ARNm avec lesquels elles sont liées de manière spécifique *in vivo*, puisqu'elles reconnaissent n'importe quel ARN double brin lors d'essais *in vitro* (Wickham et al., 1999). Afin d'identifier certains des ARNm endogènes faisant partie des mêmes complexes que Stau1, une première étude à grande échelle a été réalisée via la méthode RIP-CHIP (Kim et al., 2005). Cette étude a permis d'identifier l'ARNm *arf1* comme étant associé à Stau1 et a aussi montré

que Stau1 reconnaissait une région de 230 nucléotides dans le 3'UTR de cet ARNm (Kim et al., 2005). Cette région a alors été nommée site de liaison de Staufen ou SBS (*Staufen-binding site*). Une étude subséquente a permis d'établir que cette région contenait une tige continue de 19 paires de bases, qui est conservée autant chez l'humain que chez la souris et le rat, ce qui semble indiquer son importance (Kim et al., 2007). Ainsi, des mutations introduites dans la tige afin de détruire sa complémentarité perturbent de façon importante l'interaction de Stau1 (Kim et al., 2007). Une double mutation de la tige, afin de lui restituer sa complémentarité, redonne la capacité à Stau1 de s'associer avec celle-ci, bien que ce soit moins efficace que dans le cas de la tige non mutée. Puisque la double mutation modifie sa séquence, ceci semble signaler une implication pour la séquence de l'ARNm, en plus de sa structure, dans la reconnaissance spécifique de la RBP (Kim et al., 2007). Enfin, si la structure complexe formée d'autres tiges et de boucles qui coiffe la tige de 19 paires de bases est supprimée, la capacité de Stau1 à lier la tige diminue d'environ 50% (Kim et al., 2007). Ces résultats montrent donc qu'il n'est vraiment pas simple d'identifier les déterminants de la spécificité entre les protéines Staufen et leurs cibles. D'autant plus que les autres ARNm endogènes présents dans le même complexe que Stau1 ne semblent pas contenir de tiges aussi longues que 19 paires de bases (Kim et al., 2007).

Une étude récente a également tenté d'identifier certains éléments responsables de cette spécificité. En premier lieu, cette étude a révélé que les 3'UTR des ARNm liés par Stau1 et Stau2 sont en moyenne entre trois et quatre fois plus long que les 3'UTR des ARNm qui ne sont pas liés par les deux paralogues (Laver et al., 2013). Également, trois types de structures ont été identifiés grâce à différentes analyses informatiques comme étant des cibles idéales de Stau chez la drosophile. Cependant, la complexité de la situation demeure, étant donné que ces structures sont constituées de tiges de différentes longueurs, et certaines sont même des tiges de complémentarité imparfaite (Laver et al., 2013). Il sera intéressant de voir si la complémentarité imparfaite des structures reconnues par Stau représente un déterminant de la spécificité de son interaction (Laver et al., 2013). Cette question est particulièrement intéressante étant donné qu'une autre étude a montré que Stau1 peut s'associer à une structure double brin de complémentarité imparfaite entre une séquence Alu, un élément répété couramment retrouvé à travers le génome humain, présente dans le 3'UTR d'un ARNm et une

autre séquence Alu se trouvant sur un ARN non-codant lncARN, qui a été nommé ½-sbsARN (Gong and Maquat, 2011). Ainsi, une séquence Alu dans un 3'UTR peut être liée par différents lncARN, et un même lncARN peut lui-même s'associer avec plusieurs 3'UTR différents, ce qui présente de nombreuses possibilités d'interaction entre Stau1 et ses ARNm cibles (Gong and Maquat, 2011).

Une autre étude à grande échelle de RIP-CHIP a permis d'identifier de très nombreuses cibles de Stau1⁵⁵, de Stau2⁵⁹ et de Stau2⁶² dans le but de vérifier si les deux paralogues, et les deux isoformes de Stau2, reconnaissent les mêmes ARNm (Furic et al., 2008). Cette étude a permis de montrer que 7% des ARNm de la lignée cellulaire HEK293T peuvent se retrouver en complexe avec Stau1⁵⁵, alors que ce nombre augmente à 12% lorsqu'il est question de Stau2⁵⁹, et de 10% pour Stau2⁶² (Furic et al., 2008). Bien que Stau1 et Stau2 soient identiques à 51% et que les dsRBD3 des deux protéines soient identiques à 77%, il existe des différences considérables dans les ARNm qui s'associent aux deux protéines. En effet, environ 60% des ARNm qui se retrouvent en complexe avec Stau1 ne sont pas associés à Stau2 (Furic et al., 2008). De même, environ 75% des ARNm présents dans les mêmes complexes que Stau2 n'interagissent pas avec Stau1 (Furic et al., 2008). Quant à la comparaison entre les deux isoformes de Stau2, la majorité des ARNm qui s'associent avec un des isoformes interagissent aussi avec l'autre, bien qu'il existe certaines différences, ce qui est étonnant considérant que leurs dsRBD3 sont complètement identiques (Furic et al., 2008). Enfin, les protéines Staufen sont peut-être impliquées dans la régulation de plusieurs opérons d'ARN différents, étant donné que les ARNm liés par celles-ci codent pour des protéines assez variées, bien qu'elles soient principalement impliquées dans le métabolisme cellulaire, la régulation de processus physiologiques, la localisation et le transport, la transcription, l'épissage alternatif et les activités catalytiques (Furic et al., 2008).

6.4 Rôles de Stau1 et Stau2 chez les mammifères

Comme la plupart des RBP, Stau1 et Stau2 sont impliquées dans plusieurs aspects de la régulation posttranscriptionnelle de l'expression. Ceux-ci seront présentés dans les prochaines sections.

6.4.1 Le transport de l'ARN

La majorité des études portant sur le transport de l'ARN chez les mammifères a été effectuée dans les neurones, où la localisation et la traduction locale des ARNm joue un rôle très important (pour plus d'informations, consulter (Sanchez-Carbente Mdel and Desgroseillers, 2008; Sossin and DesGroseillers, 2006)). Les ARNm se retrouvent ainsi dans des granules dans les dendrites, qui contiennent des RBP, et souvent, des ribosomes. Cependant, ces granules assurent que la traduction de ces ARNm ne peut se faire pendant le transport. À destination, la dépolarisation du neurone pendant la transmission neuronale permet le décompactage des ribosomes des granules et le déplacement des ARNm vers les polysomes afin de stimuler leur traduction (Krichevsky and Kosik, 2001). Tel que présenté brièvement ci-dessus, Stau1 et Stau2 ont une localisation somatodendritique dans les neurones et elles colocalisent avec des particules contenant de l'ARN dont le mouvement dans les dendrites distales dépend des microtubules (Duchaine et al., 2002; Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999; Tang et al., 2001). En fait, Stau1 et Stau2 font partie de deux types de complexes différents dans les dendrites : un large complexe comprenant des ribosomes et du réticulum endoplasmique et de plus petites particules de transport sans ribosomes, mais contenant le moteur kinésine (Duchaine et al., 2002; Kanai et al., 2004; Mallardo et al., 2003).

D'autres évidences montrent l'implication de Stau1 et de Stau2 dans ce processus. Dans le cas de Stau1, il a été observé que la déplétion de la protéine entraîne la diminution du transport dendritique d'un ARNm rapporteur fusionné avec le 3'UTR de *camkIIa*, un ARNm bien connu pour être localisé dans les dendrites, ce qui indique bien le rôle direct que Stau1 peut jouer dans ce processus (Kanai et al., 2004). De plus, une dépolarisation de neurones par le KCl permet d'augmenter la quantité d'un complexe RNP contenant Stau1 dans les dendrites distales, ce qui implique que le transport de ce complexe est modulé en fonction des signaux cellulaires (Kim and Kim, 2006). Aussi, des souris mutantes exprimant la protéine Stau1 dépourvue de son dsRBD3 ont été créées, et il a été montré que ces souris présentent une déficience dans le transport de particules d'ARN dans les dendrites, ce qui par conséquent indique que Stau1 doit être capable de lier l'ARN pour jouer son rôle dans la localisation dendritique (Vessey et al., 2008). Ces souris ne sont pas très affectées par l'absence du

dsRBD3 de Stau1, bien qu'elles présentent certains défauts dans le développement des synapses (Vessey et al., 2008). Une autre étude a également montré que la déplétion de Stau1 dans les neurones cause un changement de forme des épines dendritiques et des défauts dans l'implémentation de la plasticité synaptique à long terme (Lebeau et al., 2008).

Dans le cas de Stau2, sa déplétion a aussi permis d'observer une diminution de la localisation dendritique de certains ARNm en complexe avec la protéine (Goetze et al., 2006; Lebeau et al., 2011). Sa déplétion entraîne également une diminution du nombre d'épines dendritiques dans les neurones matures (Goetze et al., 2006). Deux études récentes ont montré que Stau2 et ses cargos d'ARN sont distribués asymétriquement lors des divisions des cellules progénitrices dans le cortex en développement de souris, afin de maintenir un équilibre entre la maintenance de ces cellules souches et leur différenciation (Kusek et al., 2012; Vessey et al., 2012). De ce fait, la déplétion de Stau2 engendre la différenciation prématurée des cellules souches progénitrices (Kusek et al., 2012; Vessey et al., 2012).

6.4.2 La régulation de la traduction

Bien que la capacité de Stau1 et de Stau2 à interagir avec les polysomes signale la possibilité qu'elles aient un rôle à jouer dans la traduction, deux études ont permis de montrer de façon plus précise comment cette fonction peut être régulée. La première étude s'est basée sur la capacité de dStau à dé-réprimer la traduction d'*oskar* chez la drosophile et le fait que Stau s'associe à des structures d'ARN pour montrer que Stau1 peut lier une structure placée à l'extrémité du 5'UTR d'un ARNm rapporteur afin de dé-réprimer sa traduction, particulièrement en favorisant son interaction avec les polysomes (Dugre-Brisson et al., 2005). La structure TAR du VIH-1 a été employée puisqu'elle était déjà connue comme étant capable d'inhiber la traduction. Une augmentation de l'activité du rapporteur a aussi été observée lorsque le SBS de *arf1* a été fusionné à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm rapporteur, bien qu'aucun effet n'ait été observé sur la traduction d'ARNm sans une telle structure dans leur 5'UTR (Dugre-Brisson et al., 2005). Il n'est donc pas surprenant que l'activité de liaison de l'ARN de Stau1 soit nécessaire afin que la protéine puisse remplir son rôle dans cette dé-répression de la traduction (Dugre-Brisson et al., 2005).

La seconde étude a montré que Stau1 peut s'associer au 3'UTR particulier de certains messagers afin de favoriser leur export nucléaire et leur traduction. En effet, certains ARNm possèdent des séquences Alu inversées répétées (IRAlu) dans leur 3'UTR qui forment souvent des structures double brin imparfaites de plus de 100 paires de bases. Ces ARNm sont alors souvent retenus dans le noyau, mais Stau1 peut lier les IRAlu présents sur ces ARNm dans le noyau et faciliter l'export nucléaire de ceux-ci (Elbarbary et al., 2013). En général, les IRAlu présents dans le cytoplasme sont reconnus par la protéine kinase R (PKR) qui est alors activée afin d'inhiber la traduction cellulaire générale. Cependant, Stau1 agit dans ce cas aussi comme un dé-répresseur de la traduction puisqu'elle favorise la traduction de l'ARNm contenant les IRAlu et empêche la liaison de PKR avec celui-ci (Elbarbary et al., 2013). En conséquence, en plus de faciliter la traduction de cet ARNm, Stau1 inhibe l'activation de PKR et la phosphorylation inhibitrice du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , ainsi que la répression globale de la traduction (Elbarbary et al., 2013). Il semble donc que Stau1 peut réguler la traduction de certains ARNm dans des contextes bien précis et il sera intéressant de voir si Stau1/Stau2 sont impliquées dans d'autres mécanismes de ce genre.

6.4.3 La dégradation de l'ARN

La protéine Upf1 est un facteur très important dans la mise en place de la dégradation d'ARNm via le mécanisme nommé NMD, une voie de contrôle de qualité assurant la dégradation d'ARNm contenant un codon stop prématuré. En cherchant des protéines pouvant interagir avec Upf1, Stau1 a été identifié (Kim et al., 2005). Un nouveau mécanisme de dégradation de l'ARN, le SMD ou *Staufen-Mediated Decay*, a de cette façon été identifié, étant donné que la déplétion de Stau1 ou d'Upf1 augmente la stabilité de l'ARNm codant pour Arf1, dont Stau1 peut lier le 3'UTR (Kim et al., 2005). Tout comme le NMD, le SMD dépend de la traduction de l'ARNm, toutefois, contrairement au NMD, le SMD est indépendant de la jonction exon-exon et n'implique pas les facteurs Upf2 et Upf3 (Kim et al., 2005). Le SMD dépend donc surtout de la capacité de Stau1 à lier le 3'UTR d'un ARNm à une bonne distance du codon stop, afin que Stau1 ne soit pas déplacé pendant la traduction, et à recruter Upf1 (Kim et al., 2005). Pour identifier des cibles du SMD, une étude à grande échelle a été réalisée à partir de cellules dans lesquelles l'expression de Stau1 a été supprimée, suivi d'une analyse

de micropuces. Cette analyse a permis de montrer que l'expression de 1,1% des transcrits est augmentée dans ces conditions (Kim et al., 2007). Ce pourcentage n'est pas très élevé, mais le SMD semble quand même avoir un rôle à jouer dans certains processus physiologiques importants.

Ainsi, le SMD semble être impliqué dans la différenciation cellulaire. Des observations initiales ont permis de montrer que le SMD est plus efficace pendant la différenciation de myoblastes C2C12 en myotubes (Kim et al., 2007). Par la suite, il a été montré que le SMD et le NMD peuvent en fait entrer en compétition, étant donné que les sites de liaison de Stau1 et d'Upf2 sur Upf1 se superposent, et que cette compétition module la différenciation des C2C12 (Gong et al., 2009). Le SMD est en fait favorisé pendant la différenciation puisqu'une de ces cibles est l'ARNm codant pour Pax3, un facteur de transcription dont la dégradation favorise la myogenèse. Au contraire, l'efficacité du NMD est diminuée, ce qui permet à la myogénine d'être exprimée, plutôt que dégradée, ce qui est aussi nécessaire pour la myogenèse (Gong et al., 2009). D'autres observations ont d'ailleurs montré que l'expression de Stau1 (et de Stau2) augmente pendant la différenciation myogénique (Belanger et al., 2003), bien qu'une autre étude encore indique que Stau1 inhibe plutôt la myogenèse par un mécanisme différent du SMD (Yamaguchi et al., 2008). Le SMD est aussi impliqué dans l'adipogenèse, c'est-à-dire la différenciation des proadipocytes en adipocytes (Cho et al., 2012a). Pendant ce processus, à tout le moins, le SMD nécessite l'interaction entre Stau1, Upf1 et PNRC2 (*Proline-rich nuclear receptor coactivator 2*), et par la suite, l'ARNm ciblé est décoiffé et est soumis à une activité exonucléase 5' vers 3' (Cho et al., 2012a). Aussi, Stau1 et PNRC2 sont abondants durant l'adipogenèse et Upf1 est hyperphosphorylé, donc dans sa forme la plus active, et le SMD peut ainsi cibler l'ARNm *klf2*, qui code pour un facteur de transcription anti-adipogénique de la famille Kruppel-like (Cho et al., 2012a). Ces exemples illustrent donc bien comment le bon fonctionnement du SMD peut être crucial pour certains processus comme la différenciation cellulaire.

Stau2 a aussi été identifiée comme pouvant interagir avec Upf1 (Miki et al., 2011; Park et al., 2013). Cependant, le rôle de cette interaction est sujet à controverse, ou à tout le moins, à des résultats contradictoires. Une première étude a montré que de faire adhérer Stau2 au

3'UTR d'un ARNm rapporteur entraîne une augmentation de l'expression du rapporteur, de façon dépendante d'Upfl (Miki et al., 2011). D'un autre côté, il a été observé que Stau2 fonctionne tout comme Stau1 dans le SMD, et stimule donc la dégradation des ARNm auxquels elle s'associe (Park et al., 2013). Cette dernière étude a aussi montré que Stau1 et Stau2 activent le SMD en favorisant l'activité hélicase d'Upfl, mais pas son activité ATPase, qui dépend tout de même de la liaison d'une molécule d'ATP à Upfl (Fig.23) (Park et al., 2013). Aussi, les protéines Staufen paraissent modifier la conformation d'Upfl en association à l'ARNm. De la sorte, l'augmentation de l'activité hélicase d'Upfl et le changement de sa conformation pourraient avoir pour conséquence de favoriser le déroulement de l'ARNm soumis au SMD et de stimuler sa dégradation, bien que ceci reste à confirmer de façon plus formelle (Park et al., 2013).

Enfin, un autre aspect qui semble important pour la mise en place du SMD est la dimérisation des protéines Staufen. Il y a quelques années, la multimérisation de Stau1 a d'ailleurs été montrée de quelques façons différentes (Martel et al., 2010). Stau1 a d'abord été étiquetée avec différents épitopes et l'immunoprécipitation de la protéine marquée d'un épitope particulier a permis de récupérer Stau1 marquée par des épitopes différents, ce qui indique que plusieurs molécules de Stau1 se retrouvent dans de mêmes complexes (Martel et al., 2010). Des études de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) ont en plus confirmé que Stau1 pouvait s'associer à elle-même dans des cellules vivantes (Martel et al., 2010). L'activité de liaison à l'ARN de Stau1 est importante pour cette association, mais des interactions protéine-protéine impliquant les dsRBD2 et dsRBD5 ont aussi été montrées (Martel et al., 2010). Des études de structure ont par la suite révélé la présence du SSM (*Staufen-Swapping Motif*) dans Stau1, site se trouvant entre le TBD et le dsRBD5 (Fig. 22) (Gleghorn et al., 2013). Le SSM d'une molécule de Stau1 peut interagir avec le dsRBD5 d'une autre molécule de Stau1, ce qui leur permet d'homodimériser, puisque deux hélices α du SSM d'une protéine peuvent s'insérer entre deux hélices α du dsRBD5 de l'autre protéine (Gleghorn et al., 2013). La dimérisation augmente ainsi l'efficacité du SMD puisqu'elle promeut l'interaction entre Stau1 et Upfl (Gleghorn et al., 2013). Dans le même but, Stau2 peut aussi homodimériser et hétérodimériser avec Stau1 (Park et al., 2013). Stau2 possède aussi un SSM, et bien qu'elle n'ait pas de dsRBD5 à proprement dit, une seule hélice α dans la

région en C-terminal du SSM est suffisante pour garantir l'interaction (Gleghorn et al., 2013; Park et al., 2013). La figure 23 résume le mécanisme du SMD, tel qu'il est connu aujourd'hui.

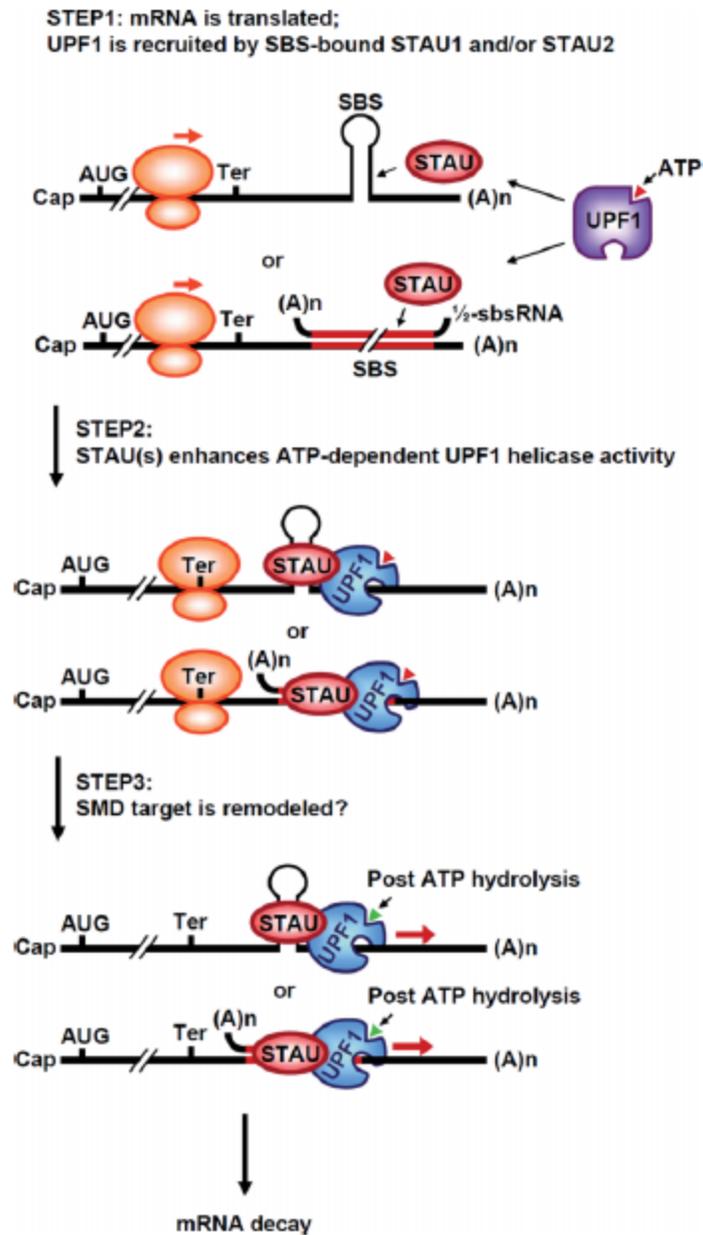


Figure 23. Un modèle pour le mécanisme du SMD.

Étape 1 : L'ARNm est traduit et Stau1 et/ou Stau2 s'associent à un SBS dans son 3'UTR, soit un SBS formé par une structure double-brin dans l'ARNm ou un SBS formé par l'association entre des séquences Alu sur le 3'UTR de l'ARNm et sur un lncARN 1/2-sbsARN.

Étape 2 : Stau1 et/ou Stau2 stimulent l'activité hélicase d'Upfl dépendante de l'ATP et favorise le changement de conformation d'Upfl.

Étape 3 : L'ARNm cible est possiblement remodelé à la suite de l'hydrolyse de l'ATP afin de faciliter la dégradation d'ARN.

Tiré de (Park and Maquat, 2013).

6.4.4 Autres fonctions

Certaines évidences montrent que Stau1 pourrait jouer un rôle dans l'export nucléaire d'ARNm possédant des séquences atypiques dans leurs 3'UTR. La promotion de l'export des ARNm avec des 3'UTR contenant des IRAlu grâce à Stau1 discuté ci-dessus en est un bon exemple. D'autres observations ont permis d'établir que Stau1 peut s'associer au 3'UTR de l'ARNm *dmpk* (*Dystrophia Myotonica protein kinase*) qui contient des répétitions CUG, ce qui entraîne généralement sa rétention dans le noyau (Ravel-Chapuis et al., 2012). L'expression de Stau1 est en fait augmentée dans les cellules musculaires DM1 (dystrophie musculaire myotonique de type 1), ce qui pourrait contrer les effets négatifs de la maladie, justement parce que Stau1 peut faciliter l'export nucléaire, et donc la traduction, de l'ARNm codant pour DMPK (Ravel-Chapuis et al., 2012). De plus, la surexpression de Stau1 dans les cellules DM1 peut venir à la rescousse de l'épissage alternatif aberrant de deux pré-ARNm, ce qui a été montré à l'aide d'un mini-gène codant pour le récepteur de l'insuline (IR). Stau1 s'associe ainsi avec le pré-ARNm codant pour IR afin de modifier son épissage alternatif (Ravel-Chapuis et al., 2012). De la même façon, Stau2 a été identifiée dans un criblage tentant d'identifier des molécules ou des protéines impliquées dans le saut d'exon de l'ARNm codant pour la dystrophine afin de trouver un traitement pour la dystrophie musculaire de Duchenne (O'Leary et al., 2009). Il apparaît par conséquent que les paralogues Staufen ont un rôle plus ou moins défini dans l'épissage alternatif.

Notre laboratoire a récemment montré que l'expression de Stau1 varie en fonction du cycle cellulaire. En effet, son expression est augmentée en tout début de mitose, puis diminue pendant la fin de la division cellulaire, lorsque la protéine est dégradée (Boulay et al., 2014). De plus en plus d'intérêt est non seulement porté aux mécanismes de régulation posttranscriptionnelle de l'expression qui ont un rôle à jouer dans la réponse aux dommages à

l'ADN et dans l'apoptose, tel qu'exposé à la section 5.2, mais aussi à ceux qui sont impliqués dans l'évolution du cycle cellulaire. Puisque l'expression de Stau1 varie en fonction des différentes phases du cycle cellulaire, plus particulièrement en mitose, il est logique de penser que cette variation a un effet sur les ARNm qui lui sont associés (Boulay et al., 2014). D'autres observations de notre laboratoire montrent que la surexpression de Stau1 perturbe la prolifération de lignées cellulaires transformées, mais qu'elle n'a pas d'effet sur les cellules normales (Boulay et al., 2014). Ainsi, peut-être que Stau1 pourrait avoir un rôle à jouer dans le traitement contre le cancer. Dans le cas de Stau2, il a été montré que l'expression ectopique de Stau2 cause une augmentation de la taille de l'œil dans des embryons de poulet, alors que la déplétion de Stau2 entraîne plutôt la formation d'un œil trop petit (Cockburn et al., 2012). En fait, la déplétion de Stau2 induit une diminution de la prolifération cellulaire dans ces cellules. Bref, en plus de leurs fonctions diversifiées dans la régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes, et grâce à ces fonctions, Stau1 et Stau2 pourraient avoir des rôles plus généraux dans des processus physiologiques majeurs comme la différenciation et la régulation de la prolifération.

7. Hypothèses et objectifs de recherche

Les résultats présentés dans cette thèse tenteront de répondre à deux questions différentes. La première concerne le rôle potentiel des protéines Staufen dans la réponse aux dommages génotoxiques et sera le point de focalisation de la thèse. La seconde question porte sur la nature des ARNm associés à Stau1 pendant la mitose.

Premièrement, étant donné que de plus en plus de RBP jouent un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN, nous nous sommes demandé si les protéines Staufen pouvaient avoir un rôle à jouer dans cette réponse également. En plus des évidences présentées ci-dessus concernant le rôle potentiel de Stau1 et de Stau2 dans la prolifération cellulaire, certaines autres observations semblent pointer vers une implication de Staufen dans la réponse au stress. D'abord, Stau1 fait partie d'un complexe avec les protéines FMRP (*Fragile X Mental Retardation 1*) et TDP-43 qui peut s'associer au 3'UTR de l'ARNm codant pour SIRT1 (Yu et al., 2012). La déplétion d'une de ces trois protéines entraîne une réduction de l'expression de

SIRT1, et comme SIRT1 a un rôle antiapoptotique, tel que présenté dans les chapitres précédents, ceci rend aussi les cellules utilisées plus sensibles aux dommages à l'ADN et à l'apoptose (Yu et al., 2012). Stau1 interagit aussi avec le 3'UTR de l'ARNm codant pour p53 et influence sa stabilité, bien qu'il ne soit pas clair comment elle stabilise *p53* dans ce cas (Siprashvili et al., 2012). Aussi, un traitement à l'éthanol dans des cellules de foie, capable d'induire l'apoptose, peut moduler l'expression de Stau2 (Castaneda et al., 2007). Par conséquent, nous avons fait l'hypothèse que l'expression de Stau1 et/ou Stau2 puisse être régulée de manière positive ou négative en réponse à un stress génotoxique, leur conférant potentiellement un rôle pro- ou antiapoptotique. Elles pourraient accomplir leur rôle en modulant la stabilité et/ou l'expression des ARNm auxquels elles sont liées. Stau1 et Stau2 s'associent toutes deux à de nombreux ARNm codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress et dans l'apoptose, comme des caspases et des facteurs de transcription de la famille E2F (Furic et al., 2008). Les objectifs ici seront donc de déterminer si l'expression des protéines Staufen varie en réponse à un stress génotoxique et si c'est le cas, de vérifier comment leur expression est affectée et possiblement quels ARNm associés à Staufen pourraient aussi être affectés.

La deuxième question à laquelle nous tenterons de répondre concerne le rôle de Stau1 pendant la mitose. En effet, puisque l'expression de Stau1 varie pendant la mitose, nous avons fait l'hypothèse que les ARNm qui lui sont associés puissent être différents de ceux qui sont liés dans des conditions asynchrones ou encore, qu'ils puissent se lier de façon plus ou moins importante pendant cette phase du cycle cellulaire, particulièrement les ARNm codant pour des protéines impliquées dans la régulation du déroulement de la mitose. En somme, le but sera de faire une étude de RIP-CHIP pour identifier les ARNm présents dans un même complexe que Stau1 au début de la mitose, alors que Stau1 est le mieux exprimée, et de comparer leur association avec Stau1 pendant la mitose et dans des cellules asynchrones.

Matériel et méthodes

1. Implication des protéines Staufen dans la réponse aux dommages à l'ADN

1.1 Plasmides et anticorps

Le plasmide pCMV-Sport-Stau2⁵⁹-FLAG₃ a été synthétisé en introduisant la séquence du clone MGC 12191 (ATCC) contenant les séquences codante, 5'UTR et 3'UTR de Stau2⁵⁹, dans le vecteur d'expression pCMV-Sport (Invitrogen). Trois séquences FLAG ont par la suite été introduites en 3' de la séquence codante de Stau2, à l'intérieur d'un site NotI digéré, préalablement introduit par PCR. Le vecteur pGL3 Stau2 a été synthétisé en introduisant la séquence se trouvant entre les sites SdaI et MreI du BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) RP11 159H1 dans le vecteur pGL3 *basic* (Promega). Les autres constructions pGL3 ont été obtenues en effectuant des délétions enzymatiques dans la séquence de pGL3 Stau2 : digestion avec EcoRI et NdeI pour pGL3 -1250, avec NdeI et BglII pour pGL3 Δ1447, avec PstI pour pGL3 -195, et avec SacII pour pGL3 Δ860. Enfin, les deux autres constructions pGL3 ont été synthétisées en insérant des séquences du vecteur pGL3 -195 dans le pGL3 *basic*: séquence entre les sites PstI et HaeII pour obtenir pGL3 -195* et séquence entre les deux sites BglII pour obtenir pGL3 -68*. Le plasmide pCMV-YFP-topaz provient de chez Packard Bioscience/PerkinElmer LifeSciences. Les plasmides pBABE-puro permettant l'expression des virus codant pour les protéines HA-ER et HA-ER-E2F1 sont un don du laboratoire du Dr. Gerardo Ferbeyre à l'Université de Montréal. Leur synthèse a déjà été décrite dans (Vigo et al., 1999).

Les anticorps reconnaissant la β-actine (Ac-74) a été acheté chez Sigma, alors que l'anticorps reconnaissant E2F1 (KH95) a été acheté chez Santa Cruz Biotechnology. L'anticorps monoclonal reconnaissant Stau1 a déjà été décrit dans (Dugre-Brisson et al., 2005), tandis que l'anticorps reconnaissant Stau2 provient de chez Sigma. Enfin, l'anticorps reconnaissant PARP1 a été acheté chez New England Biolabs.

1.2 Culture et traitements cellulaires

La lignée cellulaire HCT116 (ATCC) a été cultivée dans le milieu McCoy's (Wisent) contenant 10% de sérum bovin fœtal (PAA) La lignée cellulaire HEK293T a été cultivée dans le milieu DMEM (*Dulbecco modified Eagle's medium*) (Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau *Cosmic* (HyClone). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Pour causer des dommages à l'ADN, les cellules HCT116 ont généralement été traitées avec 300 nM de CPT (Sigma) pendant 24h. Lorsque mentionné dans la section Résultats, d'autres temps de traitements et d'autres concentrations de CPT ont été employées. D'autres types de traitements ont aussi été utilisés: 3 µM de 5FU (Sigma), 6 µM de doxorubicine (Sigma), 3 µM de MG132 (Enzo Life Sciences) tous les trois pendant 24h, ainsi que 10 J/m² d'UVC et 5 Gy d'irradiations pendant 4h ou 8h.

Pour assurer la translocation des protéines chimères HA-ER et HA-ER-E2F1 dans le noyau, les cellules ont été traitées avec 500 nM de 4-hydroxytamoxifène (Sigma) pendant 24h ou 27h.

1.3 Transfections et infections

Les transfections transitoires des cellules ont été effectuées avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), en suivant le protocole du manufacturier. Lors de ces transfections, une quantité minimale de 5 µg de plasmide était utilisée pour un pétri de 100 mm, quitte à transférer une certaine quantité de plasmide vide pour compléter. Les transfections réalisées dans le but de faire des essais luciférase ont aussi été faites à l'aide de la Lipofectamine 2000, en suivant le protocole général du manufacturier, mais elles ont été faites sur des cellules venant tout juste d'être trypsinisées (donc encore en suspension dans le milieu).

Les cellules HCT 116 ont aussi été infectées avec les particules rétrovirales codant pour HA-ER et HA-ER-E2F1 en suivant la procédure décrite dans (Ferbeyre et al., 2000).

Elles ont par la suite été sélectionnées en utilisant une concentration de 3 µg/mL de puromycine (Sigma).

1.4 Immunobuvardages de type Western

Lors de la récolte des cellules, autant les cellules adhérentes que les cellules mortes (en suspension) ont été récupérées. Les cellules ont été lysées avec le tampon suivant: 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 15 mM EGTA pH 8, 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche Applied Science), *RNAse inhibitor* (Applied Biosystems). La concentration en protéines des extraits cellulaires a été déterminée à l'aide d'essais Bradford et 20 µg de protéines ont été déposés sur gel SDS-PAGE. Les résultats des immunobuvardages de type Western ont été obtenus avec les systèmes Fluor-S-Max ou ChemiDoc MP Imaging de Bio-Rad Laboratories et aussi à l'aide d'une exposition sur film (Fujifilm). Les signaux des immunobuvardages de type Western ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageLab (Bio-Rad Laboratories).

1.5 Isolation d'ARN et RT-qPCR

L'ARN a été isolé des extraits cellulaires à l'aide du réactif TRIZOL (Invitrogen), en suivant les indications du fabricant. L'ARN a été resuspendu dans 50 µL d'eau puis digéré avec l'ADNase à l'aide de la trousse *TURBO DNA-Free* (Ambion). Les réactions de transcription inverse (RT) ont été réalisées avec 750 ng d'ARN en utilisant l'enzyme MuLV RT de la trousse *GeneAmp RNA PCR kit* (Applied Biosystems), en suivant les indications du fabricant. Les ADNc ont été synthétisés en employant l'oligo-d(T) comme amorce.

Les ADNc ont été amplifiés à l'aide de la trousse *LightCycler 480 SYBR Green I Master kit* (Roche Applied Science) et de l'instrument *LightCycler 480* (Roche Applied Science). Les amorces suivantes ont été utilisées pour l'amplification:

Stau2 Sens: 5'-GCTCTGAAGCGAAATATGCCTGTC-3'
 Antisens: 5'-TTTAAGCTCCTGTAAGACGGTGGTCG-3'

Stau2-FLAG Sens: 5'-GTACCGGACATATGCCCCGGGAATT-3'
 Antisens: 5'-AGCTAAAGTCCTTGTGGTAGGCAG-3'

Stau1 Sens: 5'-TTTGTGACCAAGGTTTCGGTTGGG-3'
 Antisens: 5'-TGGGCTTGTCTGTGGCTTGACTAT-3'

GAPDH Sens: 5'-CATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'
 Antisens: 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'

β -actine Sens: 5'-G TTCACAATGTGGCCGAGGACTTT-3'
 Antisens: 5'-T TAGGATGGCAAGGGACTTCCTGT-3'

Apaf1 Sens: 5'-GCAGAATCTTTGCACACGGTTGGA-3'
 Antisens: 5'-TTTGCGAAGCATCAGAATGCGGAG-3'

p73 Sens: 5'-CGGGCCATGCCTGTTTACAAGAAA-3'
 Antisens: 5'-T GCGAGAGATTATTGCCTTCCACG-3'

GRP78 Sens: 5'-TAGATGGGCAACTGGCTGAAAGGT-3'
 Antisens: 5'-TATTCTGCTCAGGGTCTGCCCAA-3'

CASP2 Sens: 5'-ACACCAAACGAGGTTCCCTGGTACA-3'
 Antisens: 5'-GTGCGTTCACCTTAACCAGCATGT-3'

BCL-xL Sens: 5'-AGTGAATGAACTCTTCCGGGATGG-3'
 Antisens: 5'-AAGCTGCGATCCGACTCACCAATA-3'

BCL-xS Sens: 5'-GAGCTTTGAACAGGATACTTTTGTGG-3'
 Antisens: 5'-TGGTCAGTGTCTGGTCATTTCCGA-3'

DFFB Sens: 5'-ACGCACCATCATTCCCTACACTGGT-3'
 Antisens: 5'-CACAGTTGAGCTTGTGGGTGGTTT-3'

CYCS Sens: 5'-AGTTTCAGAAAGGACCACTGGGCT-3'
 Antisens: 5'-AGATTGGGTCCACGGGCTGTTTAT-3'

RAD1 Sens: 5'-AGTGGTTCTCAAAGTGTTGTGCCC-3'
 Antisens: 5'-AGGCATCAGAATCTCCTGAGGGAA-3'

MDM4 Sens: 5'-ACCACCTTGCTGTGGTCTTGATGT-3'
 Antisens: 5'-AACCAAGATTGCGCCACTGCATTC-3'

PPP6C Sens: 5'-TCAGTAGCTTCGTGTTACTGCCCT-3'
 Antisens: 5'-GACCACACCAAGTTGTCTGCATCA-3'

E2F4 Sens: 5'-TTGATCCCACACGAGAGTGCATGA-3'
 Antisens: 5'-AGTCAGAGGTTGAGAACAGGCACA-3'.

1.6 Essais luciférase

Les essais luciférase ont été réalisés à l'aide de la trousse *Luciferase Assay System* de la compagnie Promega, en suivant leurs indications. À la suite de la lyse des cellules avec le tampon fourni dans la trousse, la concentration des protéines présentes dans les extraits cellulaires a été évaluée à l'aide d'essais Bradford. De cette façon, la concentration de chacun des extraits cellulaires a été mise à un même niveau afin d'éviter une trop grande variabilité des lectures. Les lectures YFP et luciférase ont été réalisées avec un appareil Fusion-XP (PerkinElmer LifeSciences). Le test statistique utilisé est le test T de Student.

2. Identification des ARNm associés à Stau1 pendant la prométophase

2.1 Plasmide et anticorps

Le plasmide codant pour Stau1⁵⁵-FLAG employé est le pcDNA3-RSV-Stau1⁵⁵-FLAG, qui a déjà été décrit dans (Abrahamyan et al., 2010). Les anticorps reconnaissant la β -actine (Ac-74) et l'épitope FLAG (M2) ont été achetés chez Sigma, tandis que celui reconnaissant MPM2 a été acheté chez Abcam. L'anticorps monoclonal reconnaissant Stau1 a déjà été décrit

dans (Dugre-Brisson et al., 2005), alors que l'anticorps monoclonal reconnaissant l'épitope HA a été décrit dans (Wickham et al., 1999).

2.2 Culture cellulaire, synchronisation des cellules et transfection

La lignée cellulaire HEK293T a été cultivée dans le milieu *Dulbecco modified Eagle's medium* (Invitrogen), contenant 10% de sérum de veau *Cosmic* (HyClone). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Pour synchroniser les cellules HEK293T en prométaphase, celles-ci ont été traitées avec 50 ng/mL de nocodazole (Sigma) pendant 18h, avant d'être récoltées dans un tampon phosphate salin (PBS).

La transfection des cellules HEK293T pour expression transitoire a été effectuée avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), en suivant le protocole du manufacturier.

2.3 Immunoprécipitations et immunobuvardages de type Western

Pour l'analyse de micropuces, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide codant pour Stau1⁵⁵-FLAG ou le vecteur vide, comme contrôle. Les cellules ont été synchronisées avec du nocodazole 24h après la transfection. Elles ont par la suite été lysées dans le tampon suivant: 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 15 mM EGTA pH 8, 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl, *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche Applied Science), *RNAse inhibitor* (Applied Biosystems). L'immunoprécipitation a été effectuée à l'aide de l'anti-FLAG M2 *affinity gel* (Sigma-Aldrich) et les complexes immunoprécipités ont été élués avec le peptide FLAG (Sigma-Aldrich). L'expression des protéines avant l'immunoprécipitation et les protéines immunoprécipitées ont été analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.

Pour la validation des micropuces, les cellules HEK293T ont soit été laissées asynchrones ou synchronisées en prométaphase. Elles ont ensuite été lysées avec le tampon suivant: 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 15 mM EGTA pH 8, 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche Applied Science), *RNAse*

inhibitor (Applied Biosystems). L'immunoprécipitation a été effectuée à l'aide des anticorps monoclonaux reconnaissant Stau1 et HA (comme contrôle), ceux-ci ayant d'abord été réticulés avec les billes de protéine-A sépharose avec du DMP (Thermo Scientific). Les complexes immunoprécipités ont été élués avec 100 µL de tampon SDS 2X. L'expression des protéines avant l'immunoprécipitation et les protéines immunoprécipitées ont été analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.

La concentration en protéines des extraits cellulaires avant l'immunoprécipitation a été déterminée à l'aide d'essais Bradford et 20 µg de protéines ont été déposés sur gel SDS-PAGE. Les résultats des immunobuvardages de type Western ont été obtenus avec le système Fluor-S-Max (Bio-Rad Laboratories).

2.4 Analyse de micropuces

L'ARN a été isolé des extraits cellulaires avant immunoprécipitation (input), ainsi que des complexes immunoprécipités (IP) à l'aide du réactif TRIZOL (Invitrogen), en suivant les indications du manufacturier. L'ARN de l'input a été resuspendu dans 50 µL d'eau et l'ARN de l'IP, dans 20 µL d'eau, puis digéré avec l'ADNase à l'aide de la trousse *TURBO DNA-Free* (Ambion). Les sondes biotinylées ARNc ont été synthétisées avec la trousse *Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit* (Ambion). L'hybridation a été réalisée à l'aide des micropuces *Human Whole Genome-6_V3 BeadChips* (48 803 ensemble de sondes) d'Illumina (n = 3). Les puces hybridées ont été analysées avec système *iScan* d'Illumina et les résultats ont été enregistrés avec le logiciel *BeadStudio*. Le logiciel FlexArray 1.6.2 a alors été utilisé pour comparer les intensités de signal entre les gènes enrichis dans l'IP spécifique par rapport à l'IP contrôle. Le bruit de fond a été corrigé à l'aide de contrôles négatifs. Chaque ensemble de sondes présentant un enrichissement de plus de 2,5 fois par rapport au contrôle (valeur p du test $t < 0,05$) a été identifié comme étant un ARN possiblement associé à Stau1. Les données des micropuces ont été déposées dans la base de données GEO et sont accessibles à l'aide des numéros de série GSE51182 and GSE51183.

2.5 Validation des micropuces par RT-qPCR

L'ARN a été isolé des extraits cellulaires avant immunoprécipitation (input), ainsi que des complexes immunoprécipités (IP) à l'aide du réactif TRIZOL (Invitrogen), en suivant les indications du fabricant. L'ARN de l'input a été resuspendu dans 50 µL d'eau et l'ARN de l'IP, dans 20 µL d'eau, puis digéré avec l'ADNase à l'aide de la trousse *TURBO DNA-Free* (Ambion). Les réactions de transcription inverse ont été réalisées avec 750 ng d'ARN de l'input ou avec 3 µL de l'IP en utilisant l'enzyme MuLV RT de la trousse *GeneAmp RNA PCR kit* (Applied Biosystems), en suivant les indications du fabricant. Les amorces antisens spécifiques ont été employées pour synthétiser les ADNc:

RPL22: 5'-TTGCTGTTAGCAACTACGCGCAAC-3',
APAF1: 5'-TTTGCGAAGCATCAGAATGCGGAG-3',
RB1: 5'-TGAGCACACGGTCGCTGTTACATA-3',
SPBC24: 5'-ACTCCAGAGGTAGTCGCTGATGAA-3',
JUB: 5'-AACAAGCTCCACACCCACAGAGAT-3',
MOBK2B: 5'-TGATGTGGAGAGCTTTGGGAAGGT-3',
VHL: 5'-TGACAAACCCTGACTGAAGGCTCA-3'.

Les ADNc ont été amplifiés à l'aide de la trousse *LightCycler 480 SYBR Green I Master kit* (Roche Applied Science) et de l'instrument *LightCycler 480* (Roche Applied Science). Les amorces antisens ci-dessus ont été employées, en plus des amorces sens suivantes:

RPL22: 5'- TGGTGACCATCGAAAGGAGCAAGA-3',
APAF1: 5'- GCAGAATCTTTGCACACGGTTGGA-3',
RB1: 5'- TCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA-3',
SPBC24: 5'- TTATGAGTGTGAGCCAGGGATGGT-3',
JUB: 5'-GGTTGCTGCCTGTATTCCCTGTTT-3',
MOBK2B: 5'- TACCAGTTGTGCTTCAGCCTCCTT-3',
VHL: 5'- TACATCCGTAGCGGTTGGTGACTT-3'.

Résultats

1. Implication des protéines Staufen dans la réponse aux dommages à l'ADN

Pour vérifier si les protéines Staufen ont un rôle à jouer dans la réponse à un stress génotoxique, nous avons principalement employé la drogue CPT, un inhibiteur de la topoisomérase I dont le rôle a été détaillé dans la section 1.2.2 de l'introduction, pour causer des dommages dans l'ADN. Étant donné qu'un des analogues de la CPT, l'irinotecan, est généralement utilisé pour traiter des cancers colorectaux (Chabner and Roberts, 2005), la grande majorité des expériences dont les résultats sont présentés dans cette section ont été réalisées dans la lignée cellulaire humaine de carcinome colorectal HCT116.

1.1 L'expression de Stau2, mais pas de Stau1, est modulée en réponse à un stress génotoxique

Tel que décrit dans l'introduction, l'expression de nombreuses protéines peut être affectée en réponse à des dommages à l'ADN. Puisque nous savons que l'expression de Stau1, et possiblement aussi de Stau2, peut varier en fonction des conditions cellulaires, comme lors de la différenciation ou lors de la progression du cycle cellulaire, nous nous sommes d'abord demandé si l'expression des paralogues pouvait varier à la suite d'un traitement avec des concentrations croissantes de CPT. Sachant qu'un traitement de 24h avec une concentration de 20 nM de CPT entraîne la sénescence des cellules HCT116 et qu'une concentration de 200 nM cause plutôt la mort cellulaire (Han et al., 2002), nous avons décidé de tester l'effet de traitements de 24h avec des doses de 50 nM, 100 nM, 250 nM et 500 nM de CPT (Fig. 24). La détection du clivage de PARP1 par les caspases a été employée afin de vérifier l'induction de l'apoptose dans les cellules traitées. La présence d'une seule bande correspondant à la protéine complète de 116 kDa indique l'absence d'apoptose, alors que l'apparition graduelle d'un produit de clivage de PARP1 de 89 kDa signifie l'induction de l'apoptose. La figure 24

présente le résultat de l'immunobuvardage de type Western effectué pour vérifier l'effet du traitement sur l'expression de Stau1 et de Stau2, ainsi que de PARP1. Tel qu'attendu, une concentration de 250 nM a permis de constater la présence d'une proportion de cellules apoptotiques, alors que la mort cellulaire n'est pas stimulée par des concentrations plus faibles. En ce qui concerne Stau1 et Stau2, il est possible de noter que l'expression des différents isoformes de Stau2 diminue de façon importante et graduelle en fonction des doses croissantes de CPT, alors que l'expression des deux isoformes de Stau1 n'est pas du tout modifiée par le stress génotoxique (Fig. 24). L'expression de Stau2 est même affectée de façon considérable par une faible dose de CPT (50 nM), alors que l'apoptose n'est pas déclenchée par cette dose et ce temps de traitement. Par conséquent, il semble que Stau1 et Stau2 ne soient pas régulées de la même façon en réponse à un stress génotoxique, ce qui indique que les deux protéines pourraient avoir des rôles différents dans ce processus.

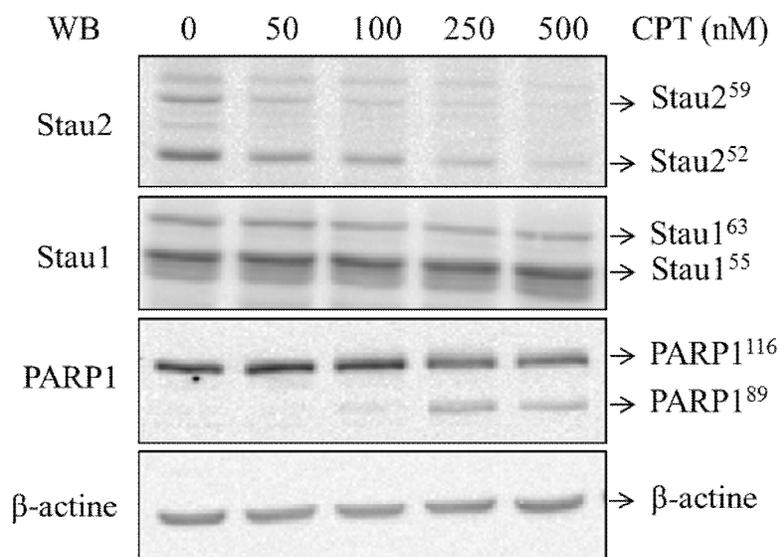


Figure 24. L'expression de Stau2, mais pas de Stau1 est régulée en réponse à des dommages à l'ADN.

Des cellules HCT116 ont été traitées avec des concentrations croissantes de CPT (50, 100, 250 ou 500 nM) ou encore avec le véhicule, du DMSO, (0 nM) pendant 24h, puis l'expression de Stau2, de Stau1, de PARP1 et de la β-actine, comme contrôle de chargement, a été analysée par immunobuvardage de type Western (WB). Les chiffres en exposant représentent la taille

en kDa de l'isoforme de la protéine qui est reconnu. Résultat représentatif de trois expériences indépendantes.

1.2 La CPT affecte l'expression de l'ARNm codant pour Stau2, mais pas celle de l'ARNm codant pour Stau1

Afin de déterminer si l'expression de Stau2 est modulée non seulement au niveau de la protéine, mais aussi au niveau de l'ARNm, l'ARN a été extrait à partir des échantillons provenant de l'expérience de dose-réponse présentée à la figure 24, et son niveau d'expression a été analysé par RT-qPCR (Fig. 25). D'abord, il est possible de constater que l'expression de l'ARNm codant pour Stau2 est modulée de façon importante par le traitement avec la CPT, son expression diminuant de presque 50% même avec une dose faible de 50 nM, qui ne cause pas de réponse apoptotique en 24h. Quant à Stau1, l'expression de son ARNm n'est pas plus touchée que l'expression de la protéine (Fig. 25). L'expression de trois autres ARNm, *p73*, *apaf1* et *grp78*, a aussi été analysée afin de s'assurer de la validité de nos résultats. Puisque *p73* et *apaf1* sont des cibles directes du facteur de transcription E2F1 et que leur expression est stimulée en réponse à des stress génotoxiques (section 4.2.2 de l'introduction), il n'est pas surprenant d'observer une augmentation de l'expression de ces ARNm (Fig. 25). Ceci est particulièrement observable lorsque les doses de CPT utilisées ne sont pas assez grandes pour stimuler l'apoptose en 24h, les protéines p73 et APAF1 devant toutes deux être exprimées avant que l'apoptose ne soit enclenchée. Quant à *grp78*, il est aussi une cible d'E2F1, mais le facteur de transcription régule de façon négative son expression en réponse à un stress, plus spécifiquement un stress du réticulum endoplasmique (section 4.2.2.2 de l'introduction). En réponse à des dommages à l'ADN, nous observons également une certaine diminution de l'expression de l'ARNm codant pour GRP78 (Fig. 25). Finalement, étant donné l'absence de réponse de Stau1 relativement au traitement génotoxique, nous avons décidé de concentrer nos efforts pour caractériser la variation d'expression de Stau2, ainsi que sa raison d'être, dans la suite de notre étude. De plus, il est intéressant de remarquer que cette variation semble se produire assez tôt dans la réponse au stress, avant que l'apoptose se déclenche.

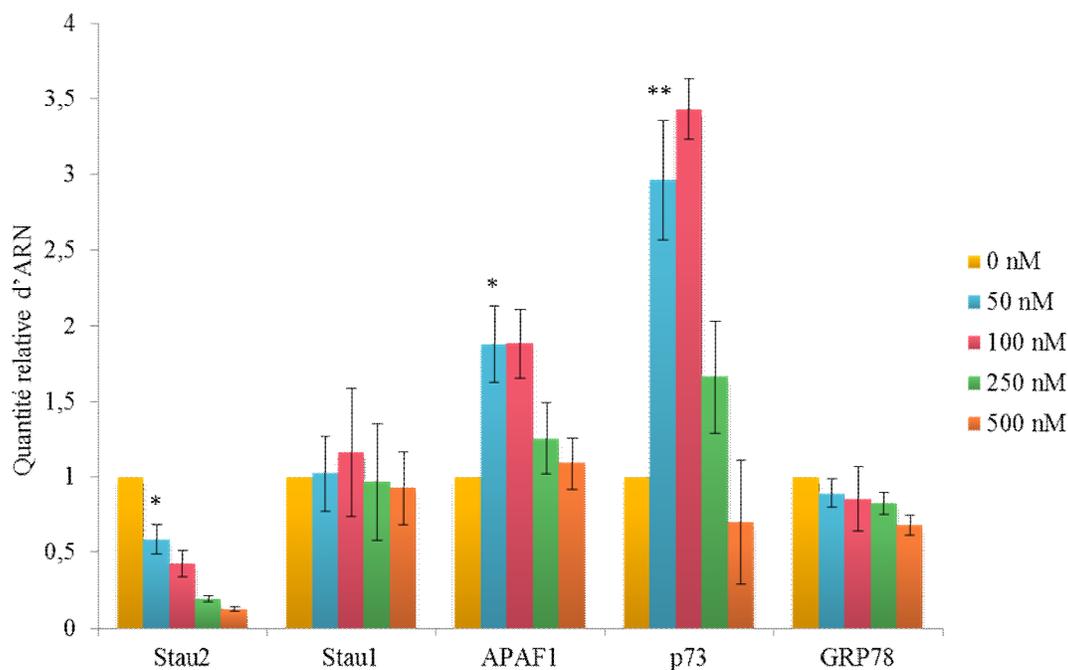


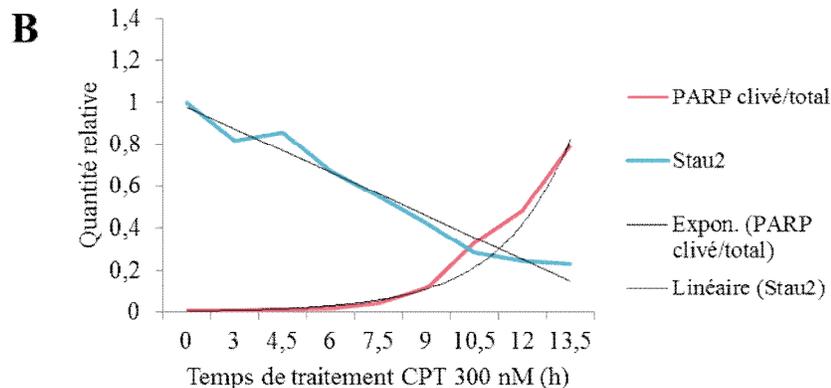
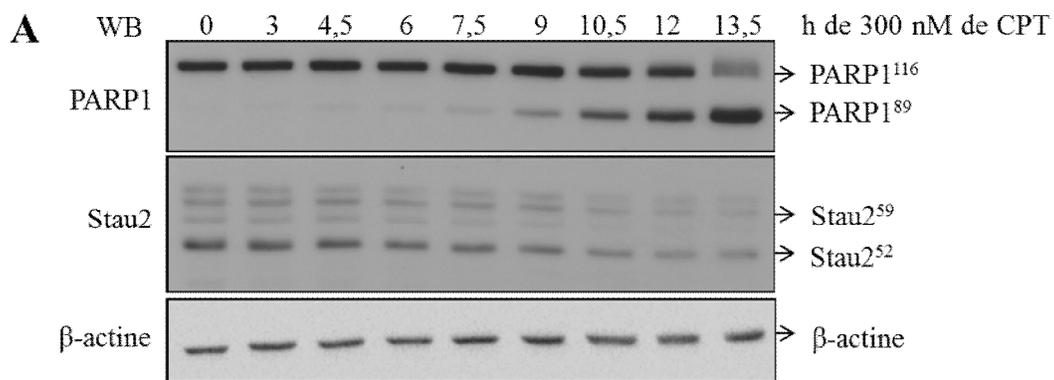
Figure 25. L'expression de l'ARNm codant pour Stau2 diminue en réponse à des dommages à l'ADN, mais pas celle de l'ARNm codant pour Stau1.

Des cellules HCT116 ont été traitées avec des concentrations croissantes de CPT (50, 100, 250 ou 500 nM) ou encore avec le véhicule, du DMSO, (0 nM) pendant 24h, puis l'expression des ARNm codant pour Stau2, Stau1, APAF1, p73 et GRP78 a été évaluée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. Les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne de trois expériences indépendantes. L'expression relative de chaque ARNm à 0 nM de CPT a arbitrairement été définie à 1. * $P < 0,05$ et ** $P = 0,01$ comparativement aux échantillons traités avec le DMSO.

1.3 La diminution de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT se produit avant que l'apoptose ne soit mise en place

Étant donné que l'expression de Stau2, autant au niveau de la protéine que de l'ARNm, est diminuée en réponse à un traitement à la CPT qui ne déclenche pas l'apoptose, nous avons fait l'hypothèse que cette diminution ne se produit pas seulement conséquemment à la mise en place de l'apoptose, mais qu'elle fait plutôt partie intégrante de la réponse aux dommages à

l'ADN. Afin de caractériser de façon plus précise la réduction de l'expression de Stau2 par rapport à l'induction de l'apoptose, nous avons réalisé une expérience permettant de suivre l'expression de Stau2 et l'induction de l'apoptose dans le temps en employant une concentration constante de CPT. Une concentration de CPT de 300 nM a ainsi été utilisée, puisque nous avons déjà établi qu'une concentration d'au moins 250 nM de CPT peut engendrer une réponse apoptotique en 24h ou moins (Fig. 24). Après avoir fait quelques essais d'optimisation pour déterminer quelle période de temps était en fait nécessaire pour bien observer un clivage graduel de PARP1 dans les cellules HCT116, nous avons appliqué un traitement de 300 nM de CPT entre 0 et 13,5h, en évaluant des échantillons à chaque 1,5h, après le premier 3h (Fig. 26).



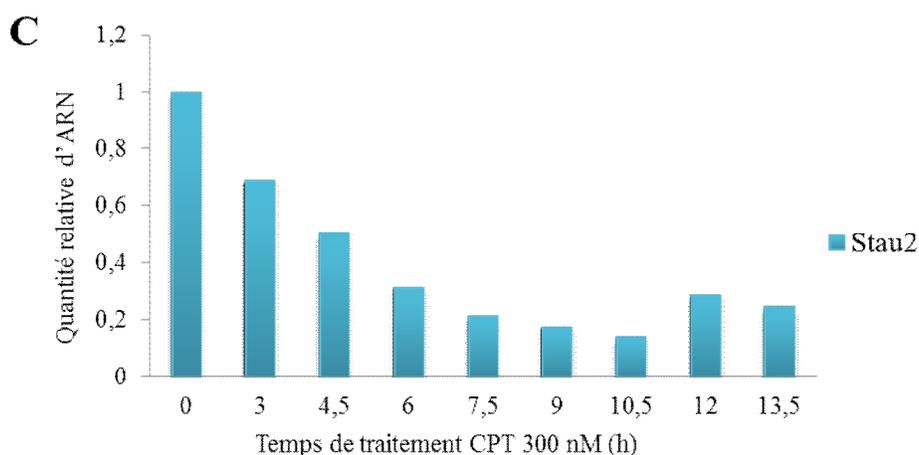


Figure 26. La diminution de l'expression de Stau2, tant au niveau de la protéine que de l'ARNm, se produit avant que l'apoptose ne soit déclenchée.

A) Des cellules HCT116 ont été traitées avec 300 nM de CPT pour des temps variant entre 0 et 13,5h, puis l'expression de Stau2, de PARP1 et de la β -actine, comme contrôle de chargement, a été analysée par immunobuvardage de type Western (WB). Résultat représentatif de deux expériences indépendantes.

B) L'expression de Stau2⁵², PARP1¹¹⁶ et PARP1⁸⁹ (clivé) a été quantifiée et normalisée en fonction de celle de la β -actine afin de représenter graphiquement la diminution de l'expression de Stau2 comparativement à l'apparition de PARP1 clivé par rapport à la quantité totale de PARP1 (clivé + non-clivé). L'expression de Stau2 au temps 0 a arbitrairement été définie à 1.

C) À partir des mêmes échantillons qu'en **A**, l'expression de l'ARNm codant pour Stau2 a été analysée pour chacun des temps par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. L'expression de l'ARNm codant pour Stau2 au temps 0 a arbitrairement été définie à 1. Résultat représentatif de deux expériences indépendantes.

Comme le montre la figure 26A, l'expression de Stau2 diminue de façon graduelle en fonction du temps. Afin d'avoir une idée plus précise de la situation, les protéines détectées par l'immunobuvardage de type Western de la figure 26A ont été quantifiées et normalisées par rapport à l'expression de la β -actine (Fig. 26B). Cette quantification indique qu'une

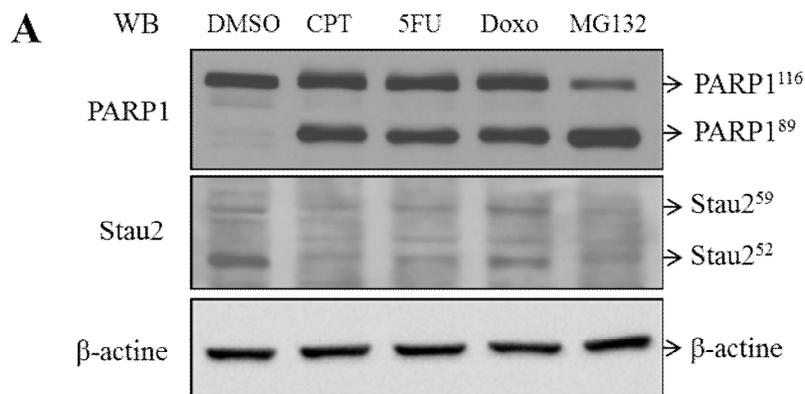
diminution d'environ 50% de l'expression de Stau2⁵², l'isoforme le mieux exprimé de Stau2, peut être observée alors que seulement 5% du PARP1 détecté représente le PARP1 clivé par les caspases, par rapport à l'expression totale de PARP1 (clivé et non-clivé) (Fig. 26B). De plus, il est possible de constater que la réduction de l'expression de Stau2 semble suivre une trajectoire linéaire, alors que l'apparition de PARP1 clivé semble plutôt suivre une courbe exponentielle, signifiant probablement que l'expression de Stau2 en réponse à un traitement à la CPT se produit indépendamment de l'induction de l'apoptose. Enfin, une analyse de l'ARNm codant pour Stau2 montre que l'expression de celui-ci est affectée encore plus rapidement que l'expression de la protéine, puisqu'il ne reste que 50% de l'ARNm *stau2* après seulement 4,5h de traitement, alors que le clivage de PARP1 peut à peine être observé à ce moment-là (Fig. 26A, C). Par conséquent, il est possible que la régulation de l'expression de Stau2 en réponse à un stress génotoxique se fasse principalement via la modulation de la quantité de son ARNm.

1.4 L'expression de Stau2 est aussi régulée par divers autres agents cytotoxiques

Tel que discuté dans l'introduction, la CPT est connue pour jouer un rôle dans l'inhibition de la transcription, en plus d'être responsable de la formation de bris double brin pendant la réplication de l'ADN (Baranello et al., 2010; Collins et al., 2001). Afin d'éliminer la possibilité que la diminution observée de l'expression de Stau2 ne soit pas due uniquement à cette fonction de la CPT, nous avons voulu vérifier l'effet d'autres agents de stress sur l'expression de Stau2 (Fig. 27). Ainsi, deux autres agents chimiothérapeutiques ont d'abord été testés, l'anti-métabolite 5-fluoro-uracile (5FU), qui est aussi principalement employé dans le traitement du cancer colorectal, et la doxorubicine (doxo), un inhibiteur de la topoisomérase II. Aussi, le MG132, un inhibiteur du protéasome, a été testé. Celui-ci n'est pas un agent couramment utilisé dans le traitement du cancer, mais son action prolongée entraîne une réponse de stress et la mort apoptotique des cellules traitées (Guo and Peng, 2013). Les doses optimales des différentes drogues afin d'obtenir une réponse apoptotique en moins de 24h ont donc été déterminées. La figure 27A montre que les trois drogues utilisées, en plus de la CPT, peuvent en effet causer une réponse apoptotique dans les cellules HCT116, ce qui est indiqué

par le clivage de PARP1. L'analyse de l'expression de Stau2 indique que le 5FU et le MG132 peuvent tous deux causer une réduction de celle-ci, alors que la doxo a très peu d'effet (Fig. 27A). L'expression de Stau2 au niveau de son ARNm a aussi été étudiée dans ce cas, et confirme que le 5FU et le MG132 ont un effet inhibiteur significatif sur la quantité de *stau2* présente dans les cellules (Fig. 27B). Quant à la doxo, les quatre répétitions de cette expérience ont donné des résultats très variables, ce qui explique l'écart-type à la moyenne démesuré qui est observé, mais en moyenne, on peut conclure que la doxo n'a pas d'effet sur l'expression de Stau2. Dès lors, ceci semble indiquer que certaines drogues peuvent réguler l'expression de Stau2, possiblement via un mécanisme commun, alors que d'autres drogues, comme la doxo, n'activent peut-être pas ce mécanisme et ne peuvent ainsi moduler l'expression de Stau2.

De plus, afin de tester si des agents génotoxiques autres que des drogues peuvent affecter l'expression de Stau2, l'effet des rayonnements UV et des irradiations (IR) sur celle-ci a été vérifié. Nos résultats préliminaires semblent indiquer que de faibles doses de ces deux agents entraînent aussi une diminution de l'expression de Stau2 au niveau de son ARNm, surtout les rayonnements UV (Fig. 27C).



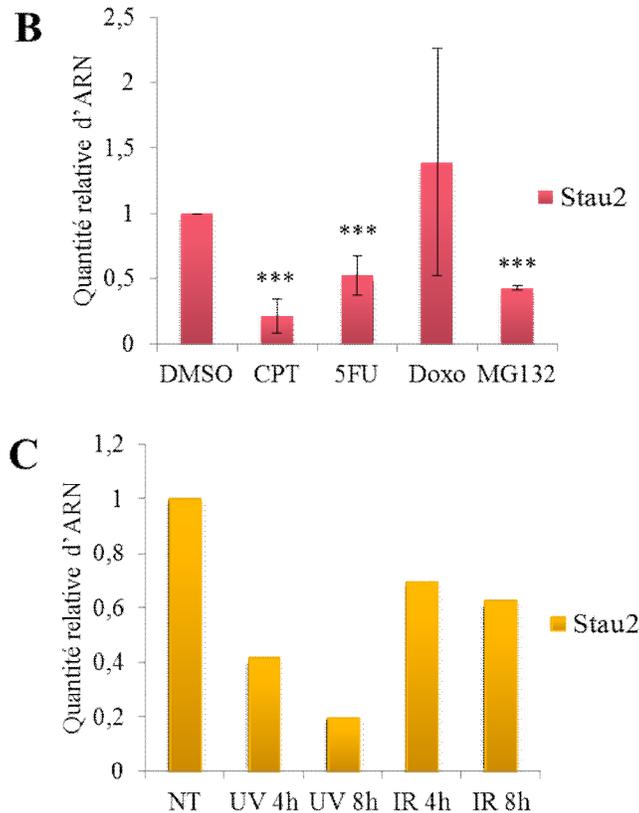


Figure 27. Effets de divers agents cytotoxiques sur l'expression de Stau2.

A) Des cellules HCT116 ont été traitées avec 300 nM de CPT, 3 μ M de 5FU, 6 μ M de doxo, 3 μ M de MG132 ou encore avec le véhicule DMSO pendant 24h, puis l'expression de Stau2, de PARP1 et de la β -actine, comme contrôle de chargement, a été analysée par immunobuvardage de type Western (WB). Résultat représentatif de quatre expériences indépendantes.

B) À partir des mêmes échantillons qu'en **A**, l'expression de l'ARNm codant pour Stau2 a été analysée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. L'expression de l'ARNm codant pour Stau2 dans les cellules traitées avec le DMSO a arbitrairement été définie à 1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne de quatre expériences indépendantes. *** $P < 0,01$ comparativement aux échantillons traités avec le DMSO.

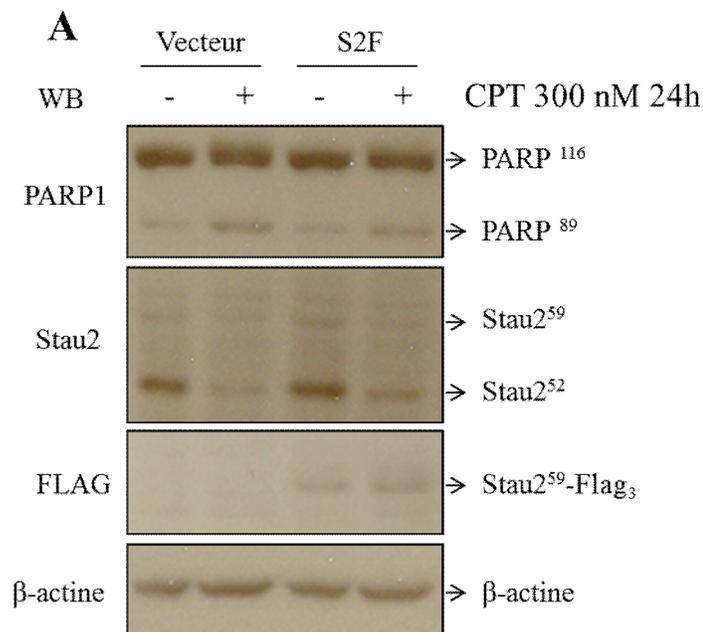
C) Des cellules HCT116 ont été laissées non traitées ou encore traitées avec 10 J/m² UVC ou avec 5 Gy IR pendant 4h ou 8h, puis l'ARN a été isolé et l'expression de l'ARNm codant pour Stau2 a été analysée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et

GAPDH. L'expression de L'ARNm codant pour Stau2 dans les cellules non traitées a arbitrairement été définie à 1.

1.5 L'expression de Stau2 non régulée par son promoteur natif n'est pas affectée par la CPT

L'obtention des résultats présentés ci-dessus nous a poussés à poser l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'expression de Stau2 à la suite d'un traitement avec la CPT se ferait grâce à la modulation de la quantité de son ARNm, donc soit via un contrôle de la transcription du gène, soit via la régulation de la stabilité de l'ARNm. Afin de déterminer quel processus entre les deux est réellement affecté par la drogue, nous avons transfecté les cellules HCT116 avec un vecteur exprimant Stau2⁵⁹-Flag₃ (S2F) sous le contrôle d'un promoteur CMV. Ainsi, si l'expression de Stau2 endogène est en fait régulée au niveau de sa transcription, l'absence du promoteur natif dans le cas de S2F devrait permettre son expression normale, même en situation de stress génotoxique. Il faut noter que le cDNA de Stau2⁵⁹ qui a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pCMV-Sport contient aussi les séquences 5'UTR et 3'UTR, afin d'exprimer l'ARNm complet de Stau2⁵⁹, les régions responsables de la régulation de la stabilité d'un ARNm se retrouvant souvent dans ces régions non-codantes. Aussi, comme le montre la figure 28, nous avons transfecté seulement une petite quantité du vecteur codant pour S2F (50 ng), afin de limiter son expression à un niveau inférieur à celle de la protéine endogène. De cette façon, nous voulions éviter qu'une surexpression trop grande de S2F entraîne une inhibition du mécanisme responsable de la réduction de la quantité de Stau2 en réponse à des dommages à l'ADN. Ceci explique donc pourquoi nous ne pouvons détecter S2F sur l'immunobuvardage réalisé avec l'anticorps reconnaissant Stau2 présenté à la figure 28A, et que sa détection est très faible sur l'immunobuvardage fait avec l'anticorps reconnaissant l'épitope FLAG. Comme S2F est étiquetée avec 3 peptides FLAG, et non un seul, ceci explique probablement la différence de détection entre les deux immunobuvardages (Fig. 28A).

La figure 28A montre donc que la diminution de l'expression de Stau2 endogène est toujours observée en réponse à la CPT, que ce soit dans les cellules transfectées par le vecteur vide ou par le vecteur codant pour S2F, et ce bien que le niveau d'induction de l'apoptose ne soit pas très important ici si on se fie au taux de clivage de PARP1. Au contraire, aucune réduction de l'expression de S2F n'est observée lorsque la CPT est employée. Pour confirmer cette observation, l'expression de l'ARNm codant pour S2F a aussi été analysée (Fig. 28B). Aucune différence significative de son expression n'est ainsi détectée lorsque des amorces reconnaissant spécifiquement S2F sont utilisées. Cependant, il est toujours possible de remarquer la diminution de l'expression de Stau2 « total », c'est-à-dire des ARNm codant pour Stau2 endogène et pour S2F ensemble, qui sont tous deux reconnus par des amorces s'associant avec la séquence de Stau2 endogène (Fig. 28B).



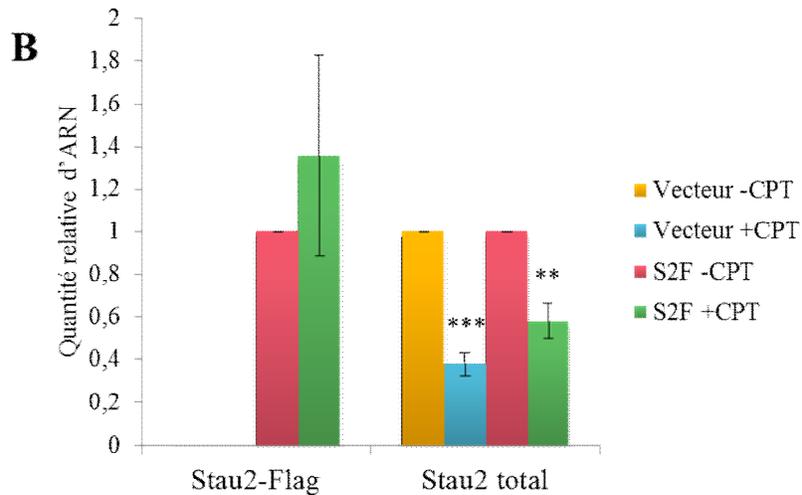


Figure 28. Lorsque la transcription de Stau2 est sous le contrôle d'un promoteur CMV, la CPT ne régule pas son expression.

A) Des cellules HCT116 ont été transfectées avec pCMV-Sport-Stau2⁵⁹-Flag₃ (S2F) ou avec le vecteur vide, puis ont été traitées avec 300 nM de CPT pendant 24h, ou avec du DMSO (-CPT). L'expression de PARP1, de Stau2 endogène, de S2F et de la β -actine, comme contrôle de chargement, a été analysée par immunobuvardage de type Western (WB). Résultat représentatif de trois expériences indépendantes.

B) À partir des mêmes échantillons que pour **A**, l'expression des ARNm codant pour S2F, reconnu par des amorces spécifiques, et pour Stau2 endogène a été analysée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. Stau2 total représente l'expression combinée de S2F et de Stau2 endogène. L'expression de l'ARNm codant pour Stau2 et/ou S2F dans les cellules traitées avec le DMSO a arbitrairement été définie à 1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne de trois expériences indépendantes. $**P = 0,01$ et $***P < 0,01$ comparativement aux échantillons traités avec le DMSO.

Les résultats présentés à la figure 28 nous ont ainsi permis de conclure que l'expression de Stau2 n'est pas régulée au niveau de la stabilité du transcrit et suggèrent qu'elle est plutôt contrôlée, au moins en partie, au niveau de la transcription en réponse aux dommages à l'ADN

causés par la CPT. Étant donné que le promoteur régulant la transcription de Stau2 n'est pas du tout caractérisé, nous nous sommes alors demandé si certains éléments régulateurs présents sur celui-ci sont responsables de l'effet observé, et si des régions particulières du promoteur sont impliquées. Notre étude s'est alors en partie concentrée à tenter de répondre à ces questions.

1.6 L'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur putatif de Stau2 peut être modulée par la CPT

L'examen de la région entourant le site d'initiation de la transcription du gène codant pour les différents isoformes de Stau2 a révélé la présence d'une région très riche en GC environ 100 nucléotides en aval de celui-ci, et environ 500 nucléotides en amont (Fig. 29A). Après avoir eu de la difficulté à amplifier et isoler cette région par PCR, en raison de cette région comprenant environ 95% de G et de C, nous avons eu recours à un clone BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) de séquences génomiques afin d'aller chercher cette région d'intérêt. En fait, à l'aide d'enzymes de restriction, nous avons isolé une région comprenant 4033 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription de Stau2, ainsi que les 197 premières paires de bases en aval de ce site, incluant la séquence complète du premier exon de la plupart des isoformes de Stau2 (Fig. 29A). Cette région a ainsi été sous-clonée en amont de la séquence codant pour le gène rapporteur luciférase dans le vecteur pGL3 (basic), construction que nous avons alors nommée pGL3 Stau2 (Fig. 29A). À partir de cette longue séquence, d'autres digestions enzymatiques ont permis d'obtenir les constructions pGL3 Stau2 -1250 et pGL3 Stau2 -195, celles-ci comprenant des régions beaucoup plus courtes en amont du site d'initiation de la transcription. De la même façon, des délétions plus ou moins longues de séquences incluant la région riche en GC ont été effectuées, afin d'obtenir les constructions pGL3 Stau2 Δ 1447 et pGL3 Stau2 Δ 860 (Fig. 29A). Afin de vérifier si le promoteur putatif de Stau2 tel qu'identifié permet de réguler l'expression de la luciférase, les constructions présentées à la figure 29A ont été transfectées dans des cellules HEK293T, étant donné que la transfection est plus efficace dans ce type cellulaire par rapport aux HCT116. Un vecteur exprimant la protéine fluorescente YFP a été transfecté de façon conjointe afin que nous puissions contrôler l'efficacité de la transfection.

Comme le montre la figure 29B, le promoteur putatif de Stau2 permet l'expression de la luciférase, lorsque placé en amont de sa région codante. La construction pGL3 Stau2, comprenant la plus longue région du promoteur putatif, semble être moins efficace dans l'induction de la luciférase que les régions plus courtes -1250 et -195, possiblement en raison d'une efficacité moins grande de transfection, étant donné la taille du plasmide, ou encore à cause de la présence d'éléments répresseurs de la transcription. Cependant, l'observation la plus flagrante que nous pouvons faire est que les délétions $\Delta 1447$ et $\Delta 860$ ne permettent pas du tout l'expression de la luciférase, ce qui indique l'importance de la région riche en GC, et possiblement d'autres éléments activateurs présents dans les régions en amont de la région riche en GC, dans le contrôle de la transcription par le promoteur de Stau2.

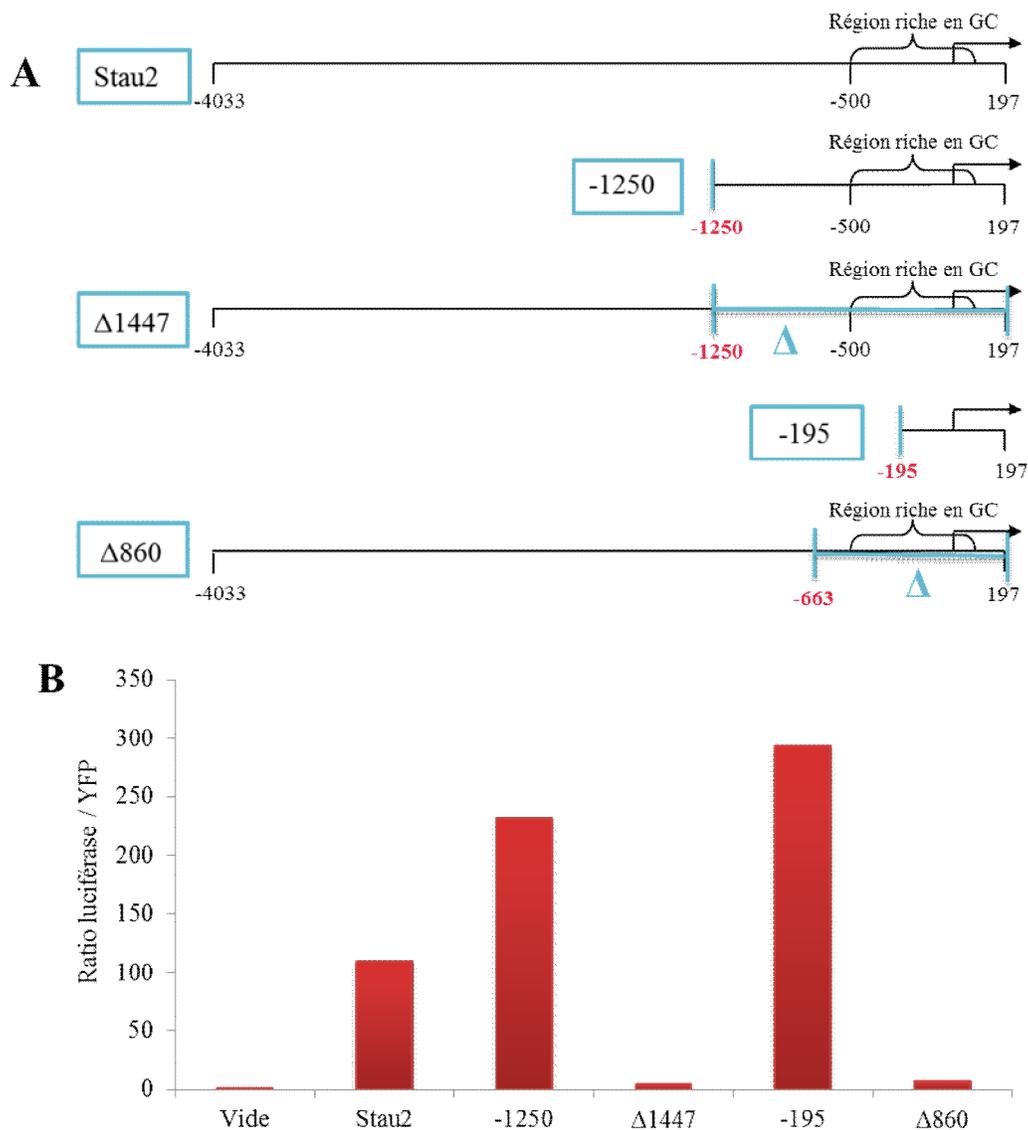


Figure 29. La région riche en GC du promoteur putatif de Stau2 assure l'expression de la luciférase.

A) Schéma illustrant la région isolée du promoteur putatif de Stau2. La séquence complète de 4230 paires de bases, isolée à l'aide de digestions enzymatiques d'un clone BAC, a été sous-clonée dans le vecteur pGL3 et a été nommée « Stau2 », tel que présenté dans l'encadré. Les régions « -1250 », « -195 », « Δ 1447 » et « Δ 860 » ont été obtenues par digestions enzymatiques de « Stau2 ». Nous avons donc les cinq constructions suivantes, pGL3 Stau2, pGL3 Stau2 -1250, pGL3 Stau2 -195, pGL3 Stau2 Δ 1447 et pGL3 Stau2 Δ 860, qui ont alors été employées dans l'expérience présentée en **B**. La présence de la région très riche en GC est présentée sur le schéma, alors que le site d'initiation de la transcription est identifié par une flèche.

B) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec 1 μ g de chacun des vecteurs pGL3 contenant les régions présentées en **A**, ou avec le vecteur pGL3 basic vide. Elles ont aussi toutes été transfectées avec 1 μ g du vecteur pCMV-Topaz-YFP, comme contrôle de transfection. L'expression de la luciférase et de la YFP a été détectée 24h après la transfection et un ratio a été fait entre les deux. Le ratio entre la luciférase et la YFP pour les cellules transfectées avec le vecteur vide a arbitrairement été défini à 1.

Afin de déterminer si le promoteur de Stau2 est sensible à la CPT, les constructions Stau2, -1250 et -195 ont alors été transfectées dans les HCT116, en employant comme contrôle le plasmide pGL3 contrôle, dans lequel l'expression de la luciférase est sous le contrôle du promoteur SV40. Il faut aussi noter que le plasmide pGL3 contrôle permet une expression très forte de la luciférase, alors nous avons dû transfecter une quantité dix fois moins élevée de ce plasmide afin d'obtenir une expression de la luciférase comparable à celle produite par le promoteur de Stau2. Après avoir soumis les cellules transfectées à un traitement avec 300 nM de CPT pendant 24h, le ratio d'expression de la luciférase par rapport à celle de la YFP a été calculé. La figure 30 montre donc que l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur SV40 n'est pas affectée par le traitement à la CPT. Cependant, la présence du promoteur putatif de Stau2 garantit effectivement une diminution d'expression de

la luciférase à la suite du traitement (Fig. 30). Il est aussi intéressant d'observer que peu importe si 4033, 1250, ou seulement 195 nucléotides sont présents en amont du site d'initiation de Stau2, la diminution d'expression de la luciférase est tout à fait semblable. Cette expérience nous a donc permis d'identifier une région minimale permettant le contrôle de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT, c'est-à-dire une région de 392 nucléotides au total, comprenant 195 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et 197 nucléotides en aval (Fig. 30).

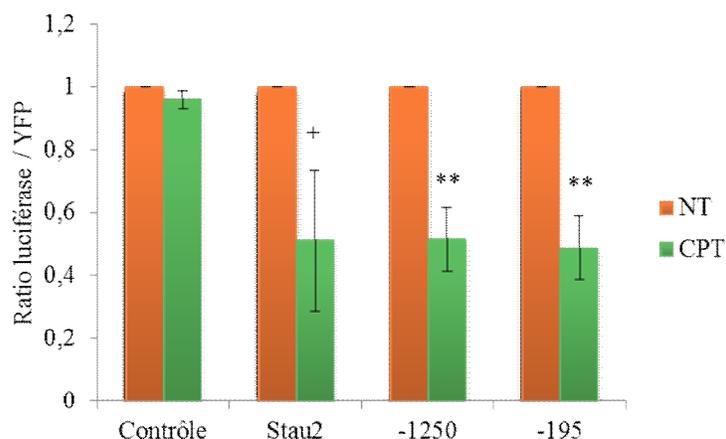


Figure 30. Le promoteur putatif de Stau2 contrôle la diminution de l'expression de la luciférase en réponse à la CPT.

Des cellules HCT116 ont été transfectées avec 100 ng du vecteur pGL3 contrôle ou avec 1 µg des vecteurs pGL3 Stau2, pGL3 Stau2 -1220 ou pGL3 Stau2 -200. Elles ont aussi toutes été transfectées avec 1 µg du vecteur pCMV-Topaz-YFP, comme contrôle de transfection. Cinq heures plus tard, les cellules ont été traitées avec 300 nM de CPT, ou avec du DMSO (NT pour non traitées) pendant 24h. L'expression de la luciférase et de la YFP a alors été détectée et un ratio a été fait entre les deux. Le ratio entre la luciférase et la YFP pour les cellules traitées avec le DMSO (NT) a arbitrairement été défini à 1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne de trois expériences indépendantes. + $P < 0,1$ et ** $P=0,01$ comparativement aux échantillons traités avec le DMSO.

1.7 La régulation de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT se fait grâce à la présence d'une région minimale dans son promoteur

Dans le but d'identifier de façon encore plus précise la région du promoteur de Stau2 nécessaire pour réguler son expression en réponse à un traitement à la CPT, de nouvelles délétions ont été réalisées à l'aide de digestions enzymatiques (Fig. 31A). Ainsi, une première délétion a permis d'enlever la majorité de la séquence se trouvant en aval du site d'initiation à la transcription, pour ne garder que les 195 paires de bases en amont. Cette construction a donc été nommée pGL3 Stau2 -195*, pour la différencier de la construction pGL3 Stau2 -195, décrite ci-dessus (Fig. 31A). Une seconde délétion a permis d'isoler une région contenant les 68 premières paires de bases en amont du site d'initiation à la transcription, ce qui nous a donc donné la construction pGL3 Stau2 -68* (l'étoile représentant dans ce cas l'absence des 197 paires de bases en aval du site d'initiation de la transcription) (Fig. 31A).

Pour déterminer l'efficacité de ces constructions dans l'induction de l'expression de la luciférase, ainsi que leur réponse à la CPT, des essais luciférase ont été effectués de la même façon telle que décrite dans la section précédente. La figure 31 montre les résultats de deux expériences indépendantes (Fig. 31B, C : première expérience; Fig. 31D, E : seconde expérience). Les résultats sont présentés de deux façons. D'abord, les figures 31B et 31D montrent les ratios entre l'expression de la luciférase et celle de la YFP pour les différentes délétions, comparativement au ratio obtenu pour le vecteur contrôle. Comme la figure 29B, celles-ci montrent que la construction -195 stimule l'expression de la luciférase de façon plus importante par rapport à la construction contenant les 4230 paires de bases au complet (Stau2). De plus, la comparaison des résultats obtenus pour les délétions -195 et -195* indique que le fait d'enlever la séquence en aval du site d'initiation de la transcription semble avoir un effet important sur l'expression de la luciférase (Fig. 31B, D), ce qui indique peut-être la présence d'éléments activateurs dans la séquence contenant le premier exon de Stau2. Par le fait même, la délétion -68* ne permet qu'une faible induction de la luciférase. Cette induction est tout de même plus importante que le bruit de fond, ce qui a été montré en comparant l'expression de la luciférase induite par -68* avec celle qui n'est pas induite par aucune séquence promotrice (pGL3 basic) (Fig. 31D).

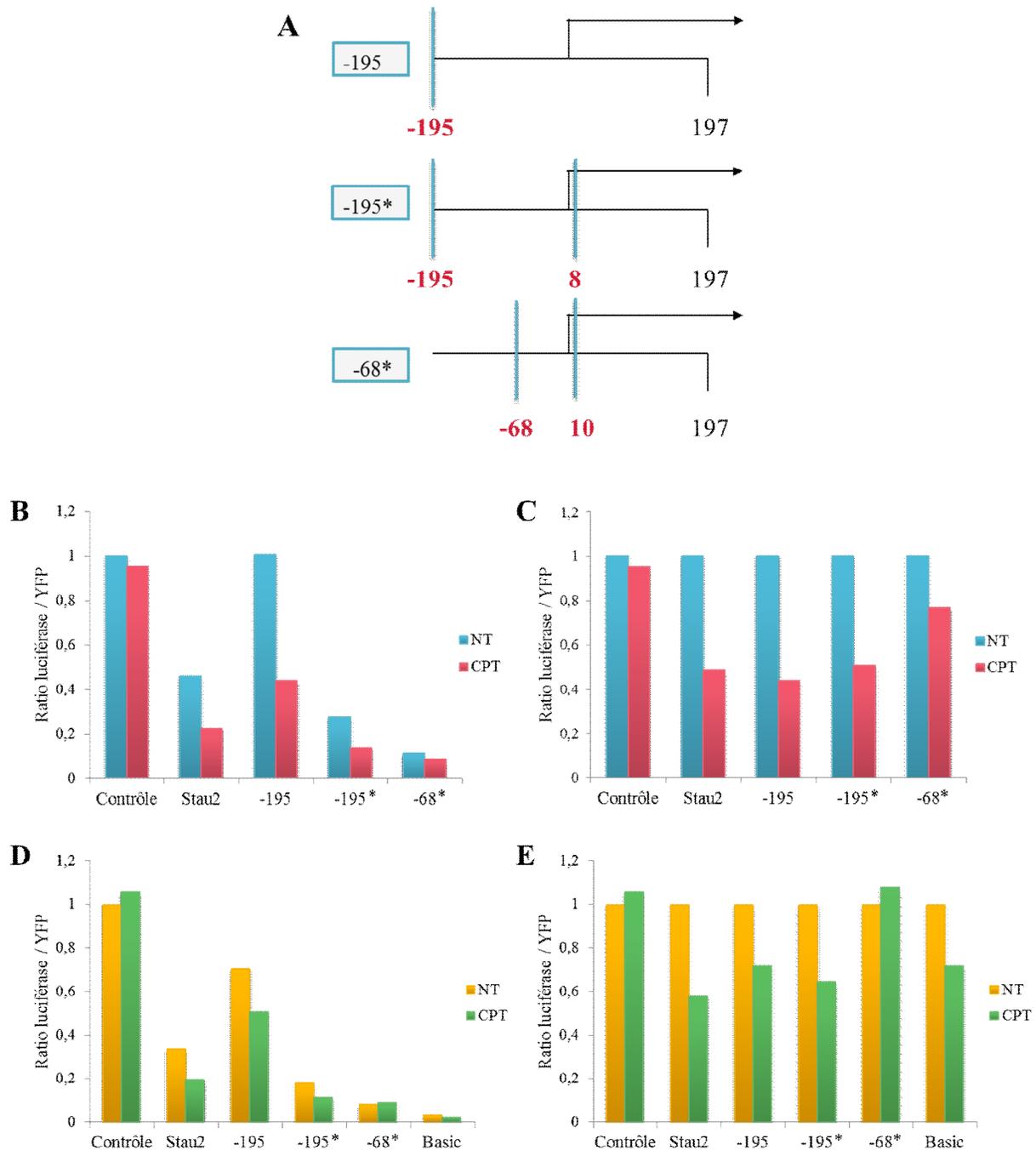


Figure 31. La séquence entre -68 et -195 en amont du site d'initiation de la transcription de Stau2 est nécessaire pour la régulation de l'expression en réponse à la CPT.

A) Schéma illustrant les délétions réalisées dans le promoteur putatif de Stau2. À partir de la construction pGL3 Stau2 -195, les constructions pGL3 Stau2 -195* et pGL3 Stau2 -68* ont

été obtenues à l'aide de digestions par des enzymes de restrictions. Le site d'initiation de la transcription est identifié par une flèche.

B à E) Des cellules HCT116 ont été transfectées avec 100 ng du vecteur pGL3 contrôle ou avec 1 µg des vecteurs pGL3 Stau2, pGL3 Stau2 -195, pGL3 Stau2 -195* ou pGL3 Stau2 -68* (ou encore avec le pGL3 basic dans **D** et **E**). Elles ont aussi toutes été transfectées avec 1 µg du vecteur pCMV-Topaz-YFP, comme contrôle de transfection. Cinq heures plus tard, les cellules ont été traitées avec 300 nM de CPT, ou avec du DMSO (NT pour non traitées) pendant 24h. L'expression de la luciférase et de la YFP a alors été détectée et un ratio a été fait entre les deux. **B** et **D)** Le ratio entre la luciférase et la YFP pour les cellules transfectées avec le pGL3 contrôle et traitées avec le DMSO (NT) a arbitrairement été défini à 1. **C** et **E)** Le ratio entre la luciférase et la YFP pour les cellules traitées avec le DMSO (NT) a arbitrairement été défini à 1 pour chacune des constructions.

Les figures 31C et 31E présentent les mêmes résultats que 31B et 31D, respectivement, mais les ratios en absence de CPT sont tous normalisés à 1. Ceci permet une comparaison plus directe entre les cellules non traitées et celles traitées avec la CPT, pour chacune des constructions employées. Les deux expériences dont les résultats sont dévoilés ici montrent toutes deux que bien que la délétion -195* ne permet pas une expression aussi élevée de la luciférase que la délétion -195, elle assure tout de même une diminution de l'expression de la luciférase à la suite du traitement à la CPT (Fig. 31C, E). Cependant, ces résultats permettent plus ou moins de conclure de façon définitive ce qui se produit avec la délétion -68*, une petite diminution étant observée à la figure 31C, alors qu'il n'y a pas du tout d'effet observé à la figure 31E. Il semble toutefois clair que la délétion -68* n'est pas aussi efficace que la délétion -195* pour réguler l'expression de la luciférase de façon négative en réponse à la CPT. Par conséquent, nos résultats indiquent que la région entre les nucléotides -68 et -195 en amont du site d'initiation de Stau2 englobe vraisemblablement des sites de régulation qui assurent la modulation de l'expression en réponse à un stress génotoxique.

1.8 Le facteur de transcription E2F1 est impliqué dans la régulation de l'expression de Stau2

Étant donné les résultats obtenus ci-dessus, nous avons voulu pousser plus loin l'étude de la régulation de l'expression de Stau2 au niveau de la transcription. Nous avons donc consulté les études d'immunoprécipitation de chromatine à grande échelle (ChIP-séq) de l'Encyclopédie des Éléments d'ADN (ENCODE, (Consortium, 2011)) afin de trouver les facteurs de transcription pouvant s'associer au promoteur putatif de Stau2, particulièrement à la séquence de 195 paires de bases identifiée ci-dessus. En plus des facteurs de transcription de base, comme TBP et TAF1, plusieurs autres facteurs de transcription reconnaissent cette région d'ADN génomique : CCNT2, CTCF, c-Myc, YY1, NF- κ B, JunD, ainsi que divers facteurs de la famille E2F, tels qu'E2F1, E2F4 et E2F6 (Consortium, 2011). Considérant le rôle bien connu d'E2F1 dans la réponse aux dommages à l'ADN, nous nous sommes donc d'abord demandé si ce facteur pouvait effectivement contrôler l'expression de Stau2. À cette fin, nous avons infecté des cellules HCT116 avec des virus codant pour des protéines chimères HA-ER ou HA-ER-E2F1, ER étant le récepteur des estrogènes. Nous avons donc obtenu deux lignées de HCT116 exprimant ces deux protéines chimères de façon stable. L'action d'E2F1 est toutefois contrôlée de façon précise, puisque l'ajout de 4-hydroxytamoxifène (OHT) assure sa liaison au récepteur et la translocation des protéines chimériques dans le noyau. Autrement, celles-ci demeurent dans le cytoplasme des cellules (Putzer et al., 2000). La translocation de la protéine HA-ER-E2F1 dans le noyau simule donc la surexpression d'E2F1, et la protéine HA-ER est ici employée comme contrôle. Dans ces conditions, nous avons donc testé la quantité d'ARNm de Stau2 qui est observée lorsqu'E2F1 est suractivée, ce qui se produit notamment pendant la réponse au stress génotoxique (Fig. 32).

Les résultats obtenus montrent ainsi que l'expression de Stau2 est augmentée de façon considérable lorsqu'HA-ER-E2F1 est déplacée dans le noyau. Ce résultat est d'ailleurs tout à fait comparable avec ce qui se produit pour l'expression des ARNm codant pour APAF1 et p73 (Fig. 32), qui sont des cibles directes d'E2F1 activées dans la réponse apoptotique (Engelmann and Putzer, 2010). Le résultat de cette expérience indique donc pour la première fois que la transcription de Stau2 est stimulée par E2F1. Cependant, étant donné que nous

observons bien une diminution de l'expression de Stau2 en réponse à des stress génotoxiques, et non une augmentation, nous aurions pu nous attendre à obtenir pour l'ARNm de Stau2 des résultats semblables à ceux obtenus pour celui de GRP78 (Fig. 32), dont l'expression peut être régulée de façon négative directement par E2F1 (Racek et al., 2008), ce qui n'est pas le cas. Par conséquent, les résultats observés nous ont poussés à poser l'hypothèse selon laquelle le traitement à la CPT pourrait en fait empêcher E2F1 d'agir comme activateur sur l'expression de Stau2.

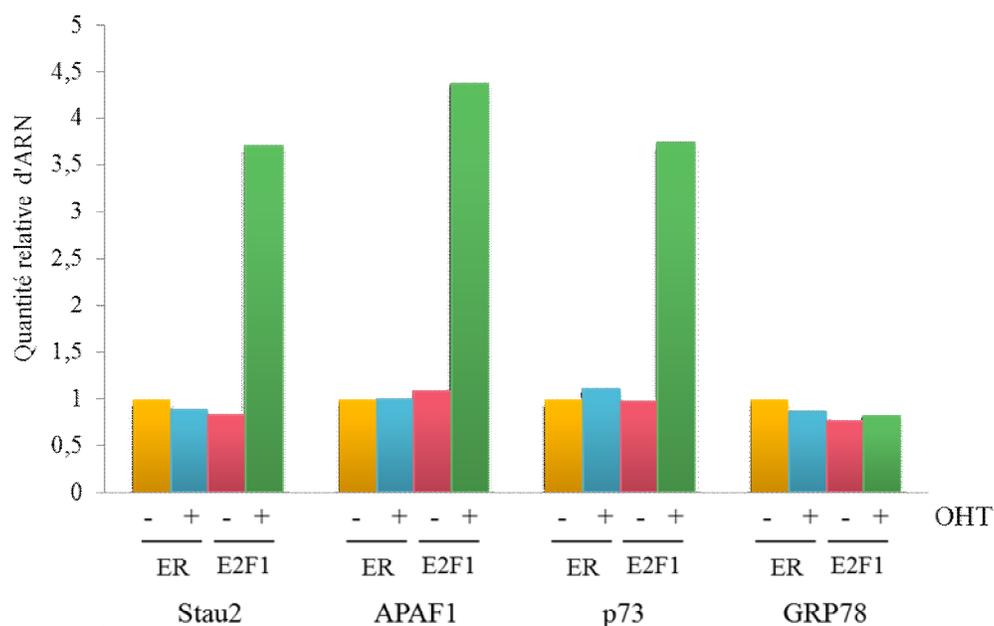


Figure 32. L'activation d'E2F1 entraîne une augmentation de l'expression de Stau2.

Des cellules HCT116 ont été infectées avec des virus codant pour les protéines chimères HA-ER (ER) et HA-ER-E2F1 (E2F1), dans le but de créer deux lignées stables de HCT116 exprimant ces protéines. Afin d'activer E2F1, les cellules ont été traitées avec 500 nM de 4-hydroxytamoxifène (+OHT) ou avec du DMSO (-OHT) pendant 24h, puis l'expression des ARNm codant pour Stau2, APAF1, p73 et GRP78 a été évaluée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. L'expression de chacun des ARNm pour la condition ER -OHT a arbitrairement été définie à 1.

1.9 Le traitement à la CPT inhibe l'effet activateur d'E2F1 sur l'expression de Stau2

Afin de définir l'effet d'un traitement à la CPT sur l'activation de l'expression de Stau2 induite par E2F1, les lignées HA-ER et HA-ER-E2F1 ont d'abord été traitées avec l'OHT pendant 3h avant d'ajouter la CPT, pour une durée totale de traitement de 27h avec l'OHT et de 24h avec la CPT. Par la suite, l'expression de Stau2 a été évaluée tant au niveau de la protéine que de l'ARNm (Fig. 33). Un immunobuvardage de type Western a permis de confirmer les résultats obtenus ci-dessus, selon lesquels l'expression de Stau2 est augmentée lorsqu'E2F1 est suractivée. Il est en effet possible d'observer une augmentation importante de la quantité de tous les isoformes codant pour Stau2 dans la condition HA-ER-E2F1 avec OHT, mais sans CPT (Fig. 33A). Il est d'ailleurs intéressant de noter que la translocation de HA-ER-E2F1 au noyau est en elle-même capable de causer une certaine réponse apoptotique, même en absence apparente d'un stress, ce qui est montré par l'augmentation de PARP1 clivé dans cette condition (Fig. 33A). En ce qui concerne notre préoccupation initiale, nous observons bien une diminution majeure de l'expression de Stau2 dans tous les cas lorsque la CPT est employée, même lorsqu'E2F1 est suractivée. Effectivement, le traitement à la CPT inhibe presque complètement l'augmentation de l'expression de Stau2 engendrée par l'activation d'E2F1 (Fig. 33A).

La figure 33B indique quant à elle que les résultats observés pour l'expression de Stau2 au niveau de la protéine se répètent au niveau de l'ARNm. Ainsi, en présence ou en absence d'OHT, les cellules HCT116 exprimant HA-ER-E2F1 et traitées à la CPT présentent une diminution du niveau d'ARNm codant pour Stau2, diminution comparable à celle qui se produit dans les cellules exprimant le contrôle HA-ER (Fig. 33B). L'expression de l'ARNm codant pour APAF1 a aussi été analysée et bien que ce soit évidemment une augmentation du niveau de cet ARNm qui est observée, la CPT ne semble pas avoir d'effet supplémentaire sur son expression (Fig. 33B). Somme toute, ces résultats indiquent qu'un possible mécanisme de répression de l'expression de Stau2 en présence de dommages à l'ADN réside dans l'inhibition du rôle activateur pouvant être joué par le facteur de transcription E2F1.

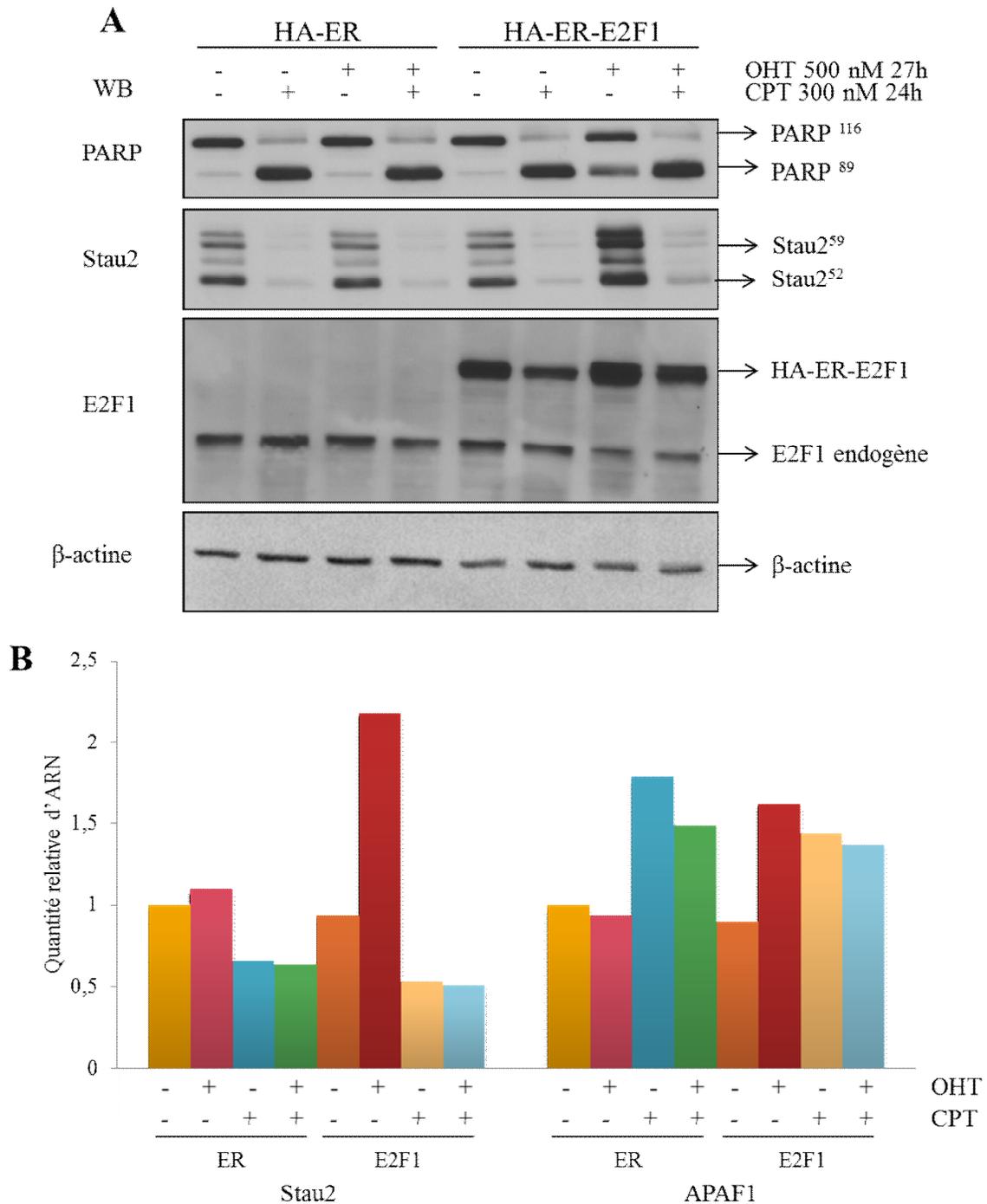


Figure 33. L'effet activateur d'E2F1 sur l'expression de Stau2 est inhibé à la suite d'un traitement à la CPT.

A) Les deux lignées de HCT116 exprimant HA-ER (ER) ou HA-ER-E2F1 (E2F1) ont été traitées avec 500 nM de 4-hydroxytamoxifène (OHT +) ou du DMSO (OHT -) pendant 27h et

aussi avec la CPT (CPT +) ou du DMSO (CPT -) pendant 24h. L'expression de PARP1, de Stau2, d'E2F1 endogène, de HA-ER-E2F1 et de la β -actine, comme contrôle de chargement, a ensuite été analysée par immunobuvardage de type Western avec les anticorps identifiés sur la figure (WB).

B) À partir des échantillons utilisés en **A**, l'ARN a été isolé et l'expression des ARNm codant pour Stau2 et APAF1 a été évaluée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. L'expression de chacun des ARNm pour la condition ER OHT- et CPT- a arbitrairement été définie à 1.

Dans le but de confirmer ces résultats d'une autre façon, les vecteurs pGL3 contrôle et pGL3 Stau2 -195 ont été transfectés dans les lignées HCT116 HA-ER et HA-ER-E2F1 afin d'évaluer l'effet de l'activation de ER-E2F1 par l'OHT et du traitement à la CPT sur l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de Stau2 (Fig. 34). Dans le cas des cellules transfectées avec le pGL3 contrôle, les résultats indiquent que le ratio entre l'expression de la luciférase et celle de la YFP ne varie pas entre les différentes conditions, soit en absence ou en présence d'OHT ou de CPT, et ce, que ce soit dans les cellules exprimant HA-ER ou celles exprimant HA-ER-E2F1 (Fig. 34). En ce qui concerne la région active du promoteur putatif de Stau2 (Stau2 -195), nous observons bien une diminution de l'expression de la luciférase dans les cellules HA-ER, traitées ou non avec l'OHT, lors de l'ajout de la CPT (Fig. 34). Le même résultat est obtenu dans les cellules HA-ER-E2F1 non traitées avec l'OHT. Enfin, dans ces mêmes cellules, il est possible de constater une certaine augmentation du ratio d'expression de la luciférase lorsque l'OHT est ajouté. Cette augmentation est alors annulée lorsque les cellules sont en plus traitées avec la CPT (Fig. 34). Ces résultats préliminaires représentent donc une situation similaire à celle observée plus haut, c'est-à-dire qu'E2F1 aurait la capacité d'activer la transcription de Stau2 via certains éléments dans son promoteur, et que la CPT pourrait inhiber cet effet activateur d'E2F1, possiblement en entraînant son déplacement du promoteur, ou d'une autre façon.

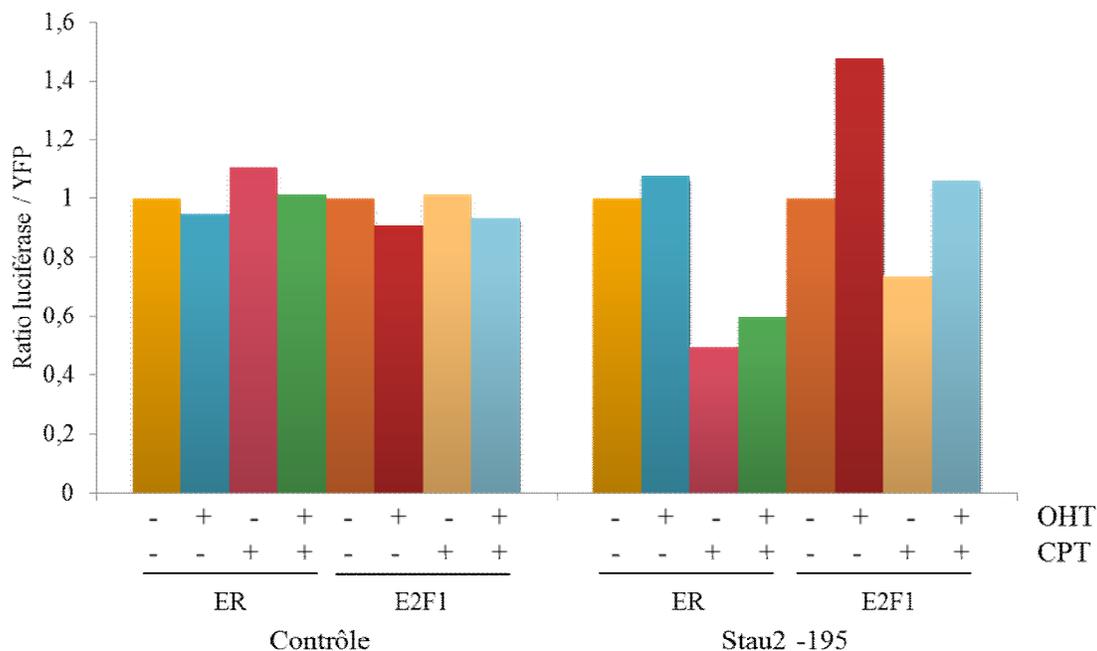


Figure 34. L'expression de la luciférase contrôlée par le promoteur de Stau2 est stimulée par l'activation d'E2F1 et la CPT empêche cette stimulation.

Les deux lignées de HCT116 exprimant HA-ER (ER) ou HA-ER-E2F1 (E2F1) ont été transfectées avec le pGL3 contrôle ou le pGL3 Stau2 -195. Elles ont aussi été transfectées avec le vecteur pCMV-Topaz-YFP, comme contrôle de transfection. Cinq heures plus tard, elles ont été traitées avec 500 nM de 4-hydroxytamoxifène (OHT +) ou du DMSO (OHT -) pendant 27h et aussi avec la CPT (CPT +) ou du DMSO (CPT -) pendant 24h. L'expression de la luciférase et de la YFP a alors été détectée et un ratio a été fait entre les deux. Le ratio entre la luciférase et la YFP pour les cellules non traitées (OHT - et CPT -) a arbitrairement été défini à 1.

1.10 La surexpression de Stau2 entraîne un retard dans l'apoptose induite par le traitement à la CPT

Les expériences dont les résultats ont été présentés précédemment ont majoritairement tenté de caractériser la diminution de l'expression de Stau2 et d'expliquer comment elle se produit. Pour tenter d'adresser sa raison d'être, ou à tout le moins, son importance dans les cellules HCT116 traitées avec un agent chimiothérapeutique, nous avons vérifié l'effet de la

surexpression de Stau2 sur le déclenchement de l'apoptose dans ces cellules traitées à la CPT. Puisque nous avons déjà déterminé que le Stau2 exogène, S2F, n'est pas affecté par ce traitement (Fig. 28), nous l'avons exprimé dans les cellules à un niveau comparable à l'expression de l'isoforme le plus abondant de Stau2, soit celui de 52 kDa (Fig. 35). Les cellules transfectées avec S2F, ou avec le vecteur vide, ont alors été soumises au traitement habituel de CPT. Dans deux expériences indépendantes, nous avons pu observer qu'effectivement, l'expression de S2F au niveau de la protéine, évaluée à l'aide d'immunobuvardages de type Western, ne varie pas malgré la présence de la drogue, comparativement à Stau2 endogène, dont l'expression chute dramatiquement (Fig. 35). Nous avons alors noté que le taux de clivage de PARP1 était manifestement moins élevé lorsque S2F est exprimé en même temps que le traitement à la CPT, lorsque l'on compare avec la transfection du vecteur vide (Fig. 35). Des résultats similaires ont aussi été obtenus en mesurant le niveau d'apoptose d'une autre manière, c'est-à-dire en mesurant directement l'activité des caspases effectrices 3 et 7 avec un test Caspase-Glo (résultats non présentés). Du coup, il semble que Stau2 pourrait avoir une fonction antiapoptotique, ce qui expliquerait la nécessité de diminuer son expression en réponse à des dommages à l'ADN, afin que ceux-ci puissent mener la cellule à déclencher une réponse apoptotique.

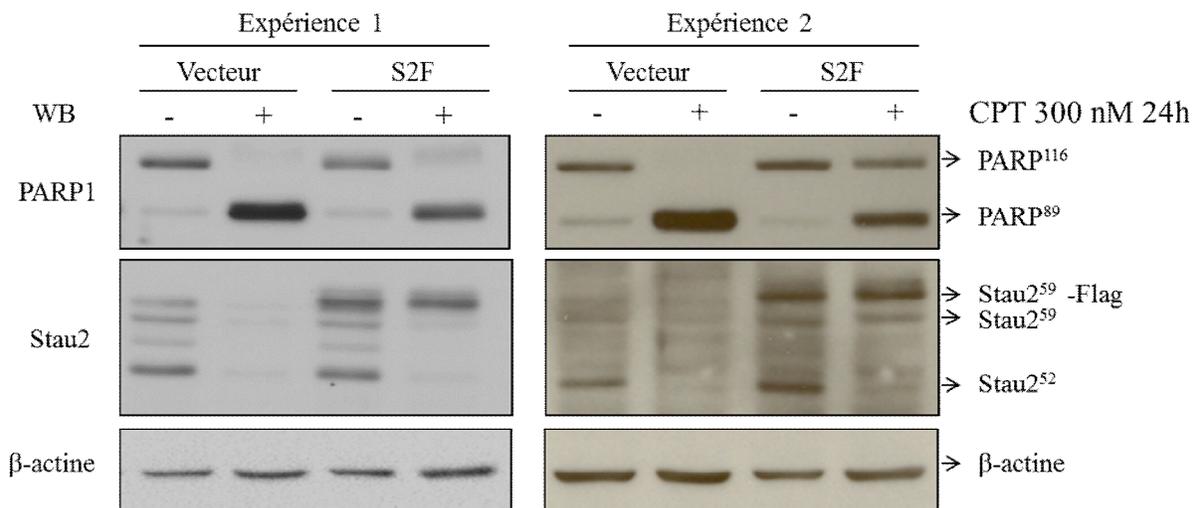


Figure 35. La présence de S2F induit un délai dans l'induction de l'apoptose causée par le traitement à la CPT.

Dans deux expériences indépendantes, des cellules HCT116 ont été transfectées avec le vecteur pCMV-Sport-Stau2⁵⁹-Flag₃ (S2F) ou avec le vecteur vide, puis ont été traitées avec 300 nM de CPT pendant 24h, ou avec du DMSO (-CPT). L'expression de PARP1, de Stau2 endogène, de S2F et de la β -actine, comme contrôle de chargement, a été analysée par immunobuvardage de type Western (WB) avec les anticorps reconnaissant PARP1, Stau2 et β -actine.

1.11 Plusieurs ARNm associés à Stau2 codent pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN

Tel que discuté dans l'introduction, les ARNm associés à Stau2 dans de mêmes complexes ont déjà été identifiés par notre laboratoire à l'aide d'une étude de micropuces dans des cellules HEK293T (Furic et al., 2008). Bien que l'étude présentée ici n'ait pas été effectuée dans le même type cellulaire, nous avons tout de même employé les données de cette analyse de micropuces afin d'identifier si Stau2 pouvait être associé à des ARNm codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose et dans la réponse aux dommages à l'ADN. De façon étonnante, une analyse de la classification GO des ARNm liés par Stau2 indique qu'environ 8% de ceux-ci se retrouvent dans la catégorie *apoptose* ou *mort cellulaire* (Furic et al., 2008), ce qui représente un pourcentage important. Un nombre important d'ARNm associés à Stau2 codent aussi pour des protéines impliquées dans divers autres aspects de la réponse aux dommages à l'ADN. L'étude de cette liste d'ARNm nous a permis de sélectionner certains ARNm dont l'interaction avec Stau2 pourrait être étudiée plus en détail. En effet, si Stau2 joue un rôle antiapoptotique, l'hypothèse la plus plausible qu'on pourrait envisager est que Stau2 remplirait son rôle en affectant l'expression ou la localisation de ces ARNm cibles. Le tableau I présente donc les transcrits codant pour des protéines potentiellement impliquées dans divers aspects de la réponse aux dommages à l'ADN, avec un accent particulier sur l'apoptose, dont l'expression ou la localisation pourrait être affectée par Stau2, et que nous avons sélectionnés pour étude plus approfondie.

Tableau I. ARNm associés avec Stau2 et codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans l'apoptose.

Les ARNm ont été identifiés à partir des données obtenues dans (Furic et al., 2008).

Symbole du gène	Nom du gène	Précisions
CASP2	Caspase 2	Caspase initiatrice de l'apoptose.
BCL2L1	BCL2-like 1 (Membre de la famille BCL2)	Code pour 2 ARNm différents : bcl-xl : antiapoptotique bcl-xs : proapoptotique
DFFB	<i>DNA fragmentation factor</i> , 40 kDa, polypeptide beta	Sous-unité β du facteur responsable de la fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose. Activé lorsque la sous-unité α est clivée par la caspase 3.
CYCS	Cytochrome c	Sa relâche dans le cytoplasme est le signal déclencheur de l'apoptose.
RAD1	<i>Rad1 homolog</i>	Fait partie du complexe 9-1-1 recruté sur des sites de dommages à l'ADN.
MDM4	<i>Mdm4 p53 binding protein homolog</i>	Inhibe p53 en s'associant à son domaine d'activation de la transcription.
PPP6C	Protéine phosphatase 6, sous-unité catalytique	Sa déplétion dans des cellules cancéreuses stimule l'apoptose (MacKeigan et al., 2005).
E2F4	<i>E2F transcription factor 4</i>	Facteur E2F répresseur. Peut lier la région minimale du promoteur de Stau2 (Consortium, 2011).

Comme première étape dans l'exploration d'un possible lien entre Stau2, ses ARNm cibles présentés dans le tableau I et la réponse aux dommages à l'ADN, nous nous sommes d'abord demandé si l'expression de ces ARNm varie à la suite d'un stress génotoxique. Dans ce but, des cellules HCT116 ont été traitées avec la dose habituelle de CPT et la quantité de

chacun des ARNm a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont présentés à la figure 36. L'expression de certains ARNm, *casp2*, *mdm4* et *e2f4*, n'a pas changé (Fig. 36). L'expression des autres ARNm semble toutefois varier de façon négative ou positive. Nous observons ainsi une diminution des niveaux de *bcl-xl* et de *bcl-xs*, ce qui est tout de même surprenant, en tenant compte du fait que *bcl-xl* code pour une protéine antiapoptotique, alors que *bcl-xs* code pour une protéine proapoptotique (Chipuk et al., 2010). Quant à *ppp6c*, une diminution est aussi observée, ce qui concorde avec les résultats montrant que la déplétion de cette phosphatase entraîne une augmentation du niveau d'apoptose dans des cellules cancéreuses (MacKeigan et al., 2005). Les trois autres ARNm, *dffb*, *cycs* et *rad1* subissent une faible augmentation de leur expression en réponse à la drogue (Fig. 36), ce qui est aussi logique étant donné l'importance des trois protéines qu'ils encodent pour la réparation de l'ADN et pour l'induction de l'apoptose. Évidemment, beaucoup de travail reste à faire pour élucider si Stau2 a un rôle à jouer dans la variation de l'expression de ces divers ARNm, ou encore si l'association de Stau2 à ceux-ci affecte plutôt leur localisation dans la cellule, ou joue un autre rôle qui n'aurait pas d'effet directement sur le taux d'expression de ces ARNm.

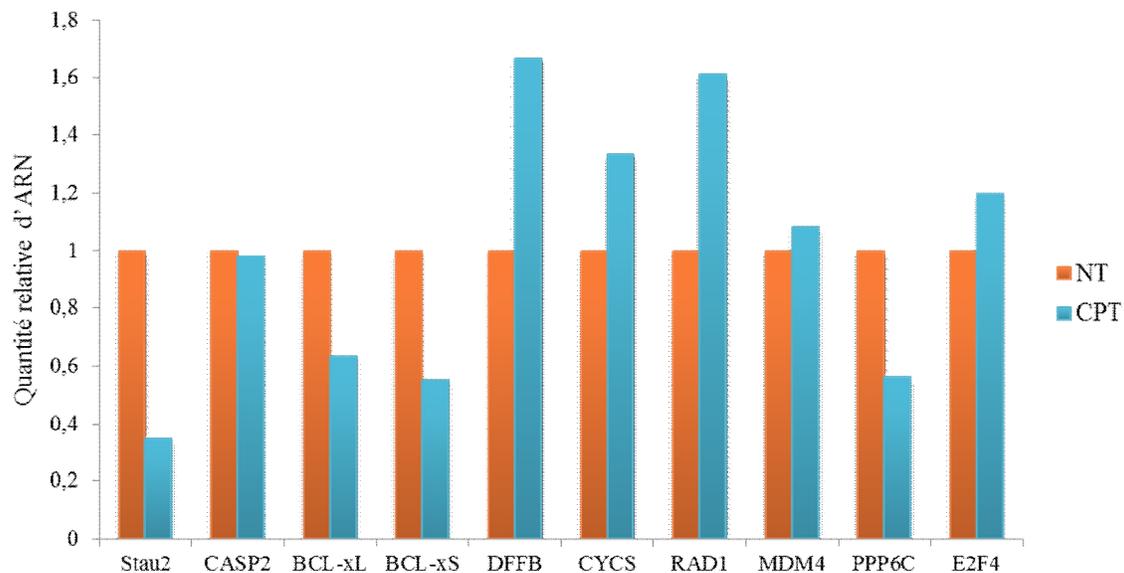


Figure 36. Effet d'un traitement à la CPT sur des ARNm associés à Stau2 et codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.

Des cellules HCT116 ont été traitées avec 300 nM de CPT, ou avec du DMSO (NT), pendant 24h, puis l'ARN a été isolé de ces cellules et l'expression des ARNm présentés dans le tableau

I a été évaluée par RT-qPCR, relativement à l'expression des contrôles β -actine et GAPDH. L'expression relative de chacun des ARNm pour la condition DMSO a arbitrairement été définie à 1.

2. Identification des ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase

Les résultats présentés dans cette section correspondent aux résultats des expériences que j'ai effectuées pour l'article suivant (Boulay et al., 2014) :

Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1

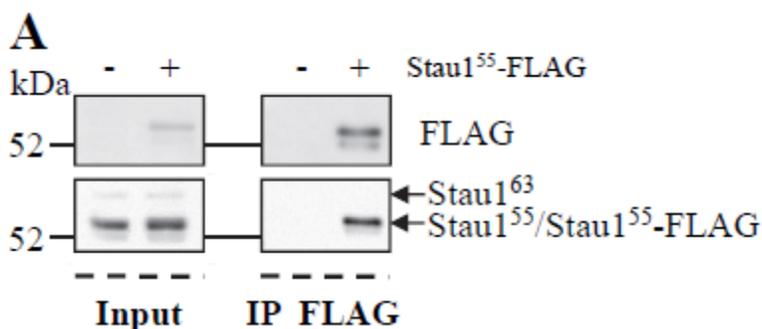
Soumis au journal *Nucleic Acids Research* en mars 2014 par les auteurs suivants : Karine Boulay, Mehdi Ghram, Wildriss Viranaicken, Véronique Trépanier, Stéphanie Mollet, Céline Fréchina et Luc DesGroseillers.

2.1 Mise en contexte

Dans cet article, nous montrons que l'expression de Stau1 varie pendant le cycle cellulaire. En fait, son expression est plus élevée entre la fin de la phase S et la prométaphase, une des premières phases de la mitose, et elle diminue ensuite pendant que la cellule complète la division cellulaire. Nous avons ainsi identifié que le système ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation de Stau1 pendant la mitose, et que le complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome (APC/C) agit en tant que médiateur dans ce processus. De plus, la surexpression de Stau1 entraîne un défaut dans l'entrée de la cellule en mitose et affecte la prolifération de cellules cancéreuses. Nos observations suggèrent donc que Stau1 pourrait avoir un rôle à jouer dans la progression du cycle cellulaire, particulièrement dans les cellules transformées. Étant donné le rôle important de Stau1 dans divers aspects du métabolisme des ARNm, nous avons voulu connaître les ARNm associés à Stau1 au moment de la prométaphase, alors que l'expression de Stau1 est élevée, mais tout juste avant sa dégradation.

2.2 Analyse par micropuces des ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase

Pour tenter de déterminer si la variation de l'expression de Stau1 pendant la mitose se produit afin de contrôler l'expression de certains ARNm, nous avons voulu répondre à deux questions différentes. Premièrement, nous nous sommes demandé si les défauts dans la mitose et dans la prolifération observés dans des cellules transformées lors de la surexpression de Stau1 pouvaient être expliqués par une modification significative de la quantité générale d'ARNm pendant la prométaphase. Nous avons ainsi transfecté des cellules HEK293T avec un vecteur codant pour Stau1⁵⁵-FLAG, ou avec le vecteur vide correspondant, puis ces mêmes cellules ont été synchronisées en prométaphase avec du nocodazole. Afin d'éviter qu'une surexpression trop importante de Stau1 affecte nos résultats, Stau1⁵⁵-FLAG a été exprimée à un niveau plus faible que celui de Stau1 endogène (Fig. 37A, Input). À la suite de l'hybridation de micropuces, nous avons comparé les niveaux d'ARNm en prométaphase entre les cellules transfectées avec Stau1⁵⁵-FLAG et celles transfectées avec le vecteur vide. La figure 37B (Total RNA) montre qu'en général, il n'y a pas de grande disparité entre les deux. En effet, seulement quatre ARNm ont été identifiés comme ayant une expression variant d'au moins deux fois entre les cellules transfectées avec Stau1⁵⁵-FLAG et celles transfectées avec le vecteur vide (Tableau II). Par conséquent, la surexpression de Stau1 n'engendre pas de changements majeurs dans l'expression des ARNm pendant la prométaphase.



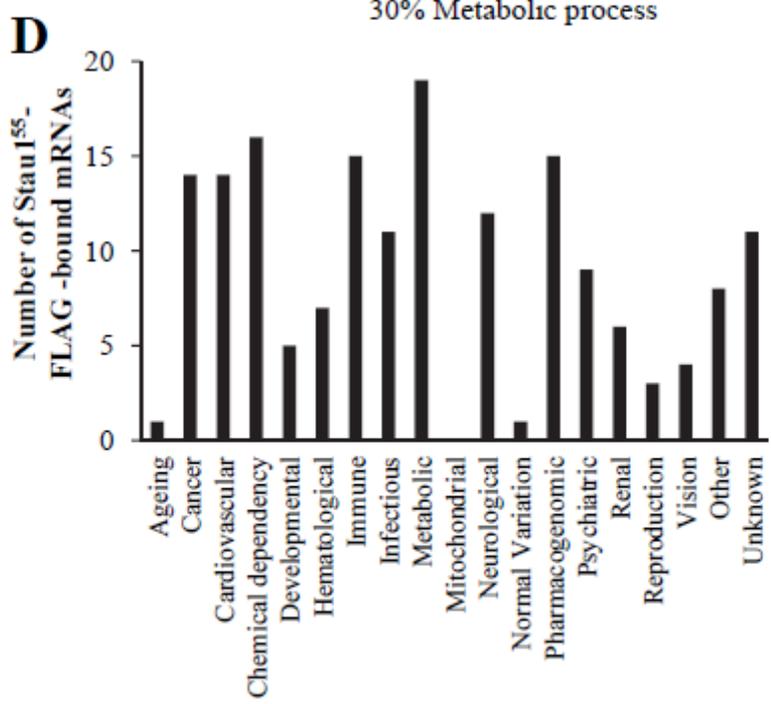
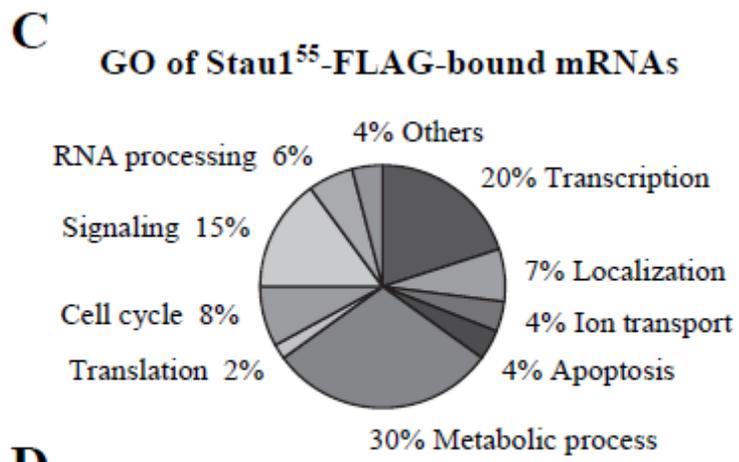
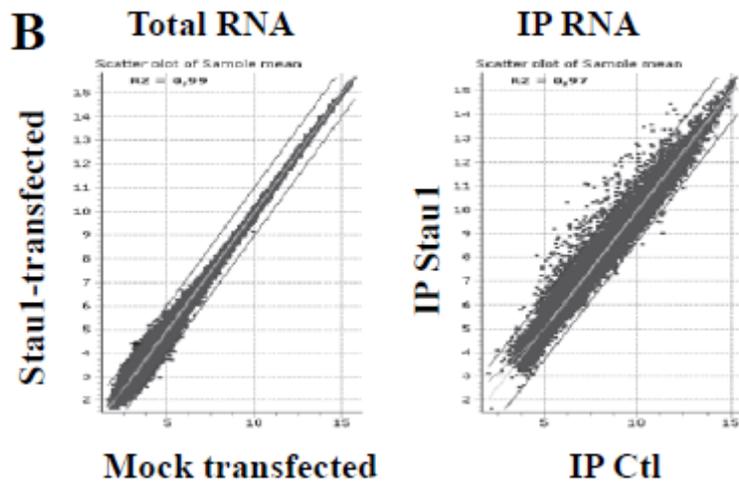


Figure 37. Analyse par micropuces de cellules HEK293T exprimant Stau1⁵⁵-FLAG lors de la prométaphase.

A) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec un vecteur codant pour Stau1⁵⁵-FLAG ou avec le vecteur vide, puis elles ont été synchronisées en prométaphase avec du nocodazole. Les cellules ont été récoltées, puis Stau1⁵⁵-FLAG et ses ARNm associés ont été immunoprécipités. L'expression de Stau1 endogène et de Stau1⁵⁵-FLAG a été analysée par immunobuvardage de type Western (Input et IP FLAG). Résultat représentatif de trois expériences indépendantes.

B) L'ARN total, provenant de l'input, et l'ARN précipité avec Stau1⁵⁵-FLAG a été isolé et utilisé pour faire une hybridation de micropuces. Les diagrammes de dispersion présentés ici montrent les relations existant entre les données obtenues pour l'ARN total (cellules transfectées avec Stau1⁵⁵-FLAG ou avec le vecteur vide (Mock)) et pour l'ARN obtenu après IP (IP contrôle vs. IP Stau1).

C) Les ARNm associés à Stau1⁵⁵-FLAG pendant la prométaphase ont été identifiés par l'analyse des micropuces et sont ici montrés groupés en fonction de la base de données *Gene Ontology* (GO).

D) Les ARNm associés à Stau1⁵⁵-FLAG ont aussi été analysés à l'aide de la base de données de la *Genetic Association* afin d'identifier ceux qui sont associés à certaines maladies.

Tableau II. Liste des ARNm dont l'expression en prométaphase varie de plus de deux fois entre les cellules exprimant Stau1⁵⁵-FLAG et les cellules contrôles.

Target ID	Sample size	Sample mean		Fold change	P-value
		Input=Ctrl	Input=Stau1		
HS.540270	3	3,972484	5,062069	2,128129	0,01302943
HS.574124	3	3,805807	5,041252	2,354539	0,03484644
LOC647082	3	3,459971	4,491984	2,044875	0,03893947
AKR1C1	3	4,857635	3,649518	0,4328333	0,03487485

Deuxièmement, nous avons voulu identifier les ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase pour tenter de comprendre comment la variation de l'expression de Stau1 se produisant à cette étape du cycle cellulaire peut agir sur le métabolisme de ses ARNm associés pendant la mitose. À partir des extraits des cellules transfectées avec Stau1⁵⁵-FLAG ou avec le vecteur vide, comme contrôle, et synchronisées en prométaphase, Stau1⁵⁵-FLAG, ainsi que ses ARNm associés, a été immunoprécipitée avec un anticorps reconnaissant l'épitope FLAG (Fig. 37A, IP FLAG). Les ARNm précipités ont alors été isolés et employés pour hybrider les micropuces d'ADN. L'analyse des résultats de ces micropuces nous a permis d'identifier 275 ARNm enrichis au moins 2,5 fois dans les complexes purifiés à partir des cellules HEK293T transfectées avec Stau1⁵⁵-FLAG comparativement à ceux obtenus à partir des cellules transfectées avec le vecteur contrôle (Fig. 37B et Tableau III). Une analyse plus poussée des résultats obtenus grâce aux micropuces à l'aide de la classification GO a permis de montrer un enrichissement des ARNm identifiés dans certaines catégories, comme les processus métaboliques, la transcription et la signalisation (Fig. 37C). Il faut aussi noter que 8% des ARNm identifiés sont classés dans la catégorie relative au cycle cellulaire (Fig. 37C). Enfin, 19 des ARNm liés par Stau1 sont associés au développement de maladies affectant le métabolisme et 14 de ceux-ci sont associés au développement du cancer (Fig. 37D). Ces informations sont utiles afin de préciser notre étude des ARNm se retrouvant en complexe avec Stau1 lors de la prométaphase et de mettre l'accent sur les ARNm codant pour des protéines impliquées dans la progression de la mitose et/ou la prolifération cellulaire, étant donné que ce sont ces processus qui sont affectés par la surexpression de Stau1.

Tableau III. Liste des ARNm associés à Stau1⁵⁵-FLAG pendant la prométaphase dans des cellules HEK293T.

Ces ARNm sont enrichis au moins 2,5 fois dans l'IP Stau1⁵⁵-FLAG par rapport à l'IP contrôle.

Target ID	Sample size	Sample	Sample	Fold change	P-value
		mean	mean		
		IP=Ctrl	IP=Stau1		
C10ORF104	3	6,304817	10,30942	16,05116	0,00127073
CYCS	3	7,25947	11,1036	14,36143	0,00052377

LOC158318	3	7,363397	11,04372	12,81996	0,00063245
C14ORF126	3	5,580631	9,22833	12,53333	0,00120748
ZFP30	3	4,602215	8,088185	11,20422	0,00170431
ACBD7	3	7,718059	10,96612	9,500885	0,00028426
MRPS16	3	10,32674	13,45432	8,7397	0,00053565
STAG3L2	3	8,238296	11,36515	8,73531	0,00136266
LPP	3	5,766685	8,847124	8,458724	0,00101233
TMEM118	3	8,845614	11,89875	8,300153	0,0002568
LOC90624	3	5,721291	8,744757	8,131186	0,0014599
NICN1	3	9,177207	12,19403	8,093846	0,00080664
C17ORF69	3	6,334383	9,346933	8,0699	0,00137087
PRKAR2A	3	6,413387	9,374557	7,787547	0,00405869
HS.193557	3	5,618461	8,574739	7,761188	0,00071132
PLCXD1	3	8,269655	11,18358	7,536679	0,00020772
VHL	3	9,108333	12,01844	7,516736	0,0006662
HS.276860	3	6,415163	9,322563	7,502649	6,05E-05
RAB2B	3	9,453696	12,3104	7,243572	0,0007506
DSCR6	3	7,324767	10,15971	7,13516	0,0005956
MMACHC	3	9,978395	12,80913	7,114349	0,00040795
CRLS1	3	10,75252	13,58262	7,111228	0,00150935
TMEM19	3	5,076018	7,889235	7,028504	0,01154991
PRR11	3	6,78469	9,597878	7,028359	0,00040833
LOC728499	3	5,41737	8,211052	6,933971	0,00526145
MCM3APAS	3	6,439642	9,205189	6,800056	0,00042183
NUTF2	3	8,474173	11,23491	6,777416	0,00150376
HS.389313	3	5,388847	8,133683	6,703138	0,00078299
FAM195B	3	9,603761	12,32189	6,580171	0,00402012
C19ORF42	3	8,366947	11,06733	6,499727	0,00176873
HS.536748	3	7,619253	10,31563	6,481721	0,00128225
CA5B	3	5,719913	8,405491	6,433388	0,00357765

PDDC1	3	9,152929	11,83374	6,412156	0,00197603
LOC374395	3	11,75592	14,43511	6,404965	0,00039441
ZNF573	3	5,31043	7,981225	6,3678	4,40E-05
MGC42630	3	8,661159	11,32919	6,355597	0,00052978
ZSWIM1	3	10,05699	12,70861	6,283758	0,00258282
HS.298873	3	4,984666	7,628666	6,25062	0,00037512
RAD1	3	5,586264	8,225754	6,231112	0,00189794
C13ORF1	3	8,71951	11,32223	6,074295	0,00068506
GNL3L	3	8,884946	11,48695	6,071299	0,00238919
HS.579239	3	5,526206	8,120299	6,038094	0,0268945
GNE	3	8,964816	11,54369	5,974714	0,00124314
HLA-DOA	3	6,126813	8,699883	5,950741	0,00041084
MRI1	3	10,78941	13,34611	5,883629	0,00094956
BPNT1	3	7,839972	10,39293	5,868355	0,00375799
C17ORF75	3	5,974233	8,515997	5,823004	0,00025508
RCP9	3	4,969548	7,498987	5,773472	0,01619307
C1ORF69	3	6,94519	9,467266	5,744079	0,00157703
HS.130916	3	6,755453	9,269719	5,713069	0,00238035
ATPBD1B	3	8,96376	11,47172	5,688139	0,00114393
TAX1BP3	3	9,687634	12,18625	5,651452	0,0065576
PAICS	3	11,59267	14,07846	5,601414	0,00070741
NDUFC2	3	6,412119	8,893057	5,582603	0,00479604
DNAJC24	3	7,240716	9,710208	5,538487	0,01146497
FAM20B	3	8,379426	10,82717	5,455639	0,00077672
QPCTL	3	6,828698	9,231763	5,289259	0,00547133
HS.42612	3	4,869643	7,248976	5,202961	0,00081402
SLC25A15	3	9,021962	11,38827	5,156188	0,00042205
HEATR3	3	7,19138	9,542336	5,10162	0,00388812
HS.582113	3	5,799806	8,149488	5,097121	0,00263188
HS.5724	3	5,347678	7,685553	5,055573	0,00018532

STAG3L1	3	6,248988	8,585486	5,050752	0,00270414
SNRPD3	3	7,991168	10,29912	4,951811	0,00194523
HS.91389	3	6,982381	9,286669	4,939238	0,00102039
CHFR	3	10,07075	12,35551	4,872858	0,00165537
MED18	3	5,376711	7,656877	4,857337	0,01132124
TMEM103	3	6,740137	8,997061	4,779713	0,00327618
GNPNAT1	3	7,088789	9,340504	4,762486	0,00237245
C8ORF55	3	12,02495	14,22213	4,585817	0,00459893
TRIM65	3	8,148628	10,33425	4,54922	0,01740038
CXORF56	3	8,262752	10,44728	4,545777	0,00405451
FCF1	3	6,743742	8,928048	4,545081	0,00919878
TAF8	3	4,847733	7,02879	4,534858	0,00844112
CTSB	3	8,963465	11,13181	4,49508	0,00046132
HS.31007	3	4,594122	6,761902	4,493312	0,00127782
HS.531457	3	7,291327	9,449932	4,464828	0,00383134
FOXRED2	3	10,04302	12,19693	4,450313	0,00091615
NMNAT1	3	6,309729	8,452123	4,41494	0,00160876
DCAF16	3	8,362474	10,49354	4,380402	0,00109968
ZYG11B	3	9,044035	11,17116	4,368449	0,00417858
PHACTR4	3	9,088335	11,21475	4,366297	0,00149951
INPP5B	3	7,694409	9,803331	4,313689	0,00576979
KCNK12	3	8,311554	10,41465	4,296315	0,03595232
ICMT	3	8,470569	10,56765	4,278415	0,00271657
METTL7A	3	7,60997	9,697432	4,249996	0,0008963
HS.538962	3	7,618664	9,704983	4,246632	3,45E-05
LOC653994	3	5,992573	8,078341	4,24501	0,04020774
LOC652685	3	8,99728	11,07765	4,229143	0,00055104
PPIA	3	7,51798	9,583913	4,187046	0,00507454
LOC731835	3	8,452743	10,51016	4,162404	0,02401466
NUP43	3	10,72357	12,77868	4,155739	0,00121132

FLJ20718	3	10,36078	12,40817	4,133598	0,01488456
C18ORF45	3	6,470092	8,508505	4,107934	0,00686724
ZNF121	3	3,913634	5,945447	4,089183	0,01101542
DUSP18	3	7,160834	9,18395	4,06461	0,0052509
BRI3BP	3	8,504996	10,52727	4,062229	9,39E-05
LOC649095	3	7,066607	9,081891	4,042602	0,01922796
LOC128322	3	5,898653	7,91192	4,036955	0,0074777
ZNF562	3	6,931549	8,937085	4,015379	0,00897463
HS.426229	3	5,151086	7,155517	4,012304	0,0002338
HS.128708	3	3,800164	5,796886	3,990924	0,00179576
ZNF623	3	5,102788	7,0986	3,988406	0,0017404
SLC19A3	3	5,839455	7,831405	3,977744	0,00192207
HIC2	3	10,0586	12,04005	3,948915	0,00071674
KENAE	3	5,228649	7,20843	3,944333	0,00864165
LOC200030	3	8,936456	10,91106	3,930203	0,00152148
HOXA13	3	6,454787	8,426507	3,922356	0,01134408
ZNF329	3	6,82528	8,792338	3,909702	0,0069869
PHCA	3	7,251414	9,21741	3,906822	0,00939414
HS.547601	3	7,539438	9,499675	3,891259	0,00039188
IFNAR1	3	7,941921	9,896425	3,875828	0,00205564
PSKH1	3	6,533988	8,486157	3,869559	0,046688
OPA3	3	6,825304	8,776073	3,865807	0,0146081
RBBP9	3	8,036893	9,965065	3,805728	0,0007233
H2AFV	3	6,121502	8,043171	3,788611	4,68E-05
FLJ10213	3	8,122294	10,04151	3,782186	0,00141745
SAMD5	3	5,590305	7,50661	3,774551	0,00055335
CWF19L1	3	11,46854	13,38196	3,767013	0,00606864
GXYLT2	3	4,56237	6,468356	3,747649	0,01607252
RYR1	3	5,726135	7,621774	3,720866	0,03014409
SLC35E3	3	8,864868	10,75815	3,714803	0,00391046

FOXK1	3	7,841582	9,723321	3,685191	6,95E-05
SEC61A1	3	12,12125	13,99646	3,668569	0,00488639
TNFAIP8L1	3	6,384041	8,251279	3,648334	0,00527539
DHFRL1	3	6,431925	8,287937	3,620057	0,01450334
MDM4	3	4,780942	6,636363	3,618571	0,00234362
SPC24	3	10,80481	12,65441	3,604021	0,00183906
LRCH3	3	7,037233	8,867952	3,557142	0,0078024
PCBD2	3	5,604601	7,430847	3,546131	0,00016129
KIAA0831	3	8,151711	9,975006	3,538887	0,00099128
AS3MT	3	7,450592	9,260214	3,505503	0,00084562
HS.163264	3	6,695042	8,497332	3,487734	0,01059011
PGPEP1	3	4,833169	6,633783	3,483685	0,00851454
WDR73	3	7,884541	9,674089	3,457067	0,00554011
F11R	3	7,440057	9,21686	3,426659	0,00293964
TXNDC15	3	7,103384	8,876934	3,418943	0,00479098
DCUN1D3	3	8,240107	10,00717	3,403601	0,00739544
PXMP4	3	5,517193	7,276272	3,38482	0,00688756
CC2D1B	3	5,896509	7,651427	3,375071	0,00153685
ESPNL	3	9,506191	11,25599	3,363108	0,00214695
DFFA	3	10,00057	11,74201	3,343687	0,00184668
TMEM91	3	6,724036	8,458183	3,326828	0,00198951
AQP11	3	6,356769	8,090403	3,325646	0,00927688
HS.551137	3	7,238712	8,964049	3,306574	0,00390411
MEX3D	3	8,201578	9,91813	3,2865	0,00248707
SNHG4	3	5,658237	7,37392	3,284521	0,0061712
ZNF529	3	8,131131	9,846099	3,282895	0,00972858
DCBLD2	3	8,870577	10,58541	3,282581	0,00573017
LOC440345	3	5,364717	7,077891	3,278814	0,00357038
IRF2BP2	3	8,248229	9,955704	3,265886	0,0019516
COL4A5	3	7,003766	8,710547	3,264317	0,00141902

ICK	3	5,64107	7,347297	3,263064	0,00080786
PGAM5	3	10,155	11,86052	3,261463	0,00404004
APOBEC3C	3	7,546025	9,23781	3,230561	0,00931813
LOC158301	3	6,045259	7,733095	3,22173	0,00261531
TRMT2B	3	6,837383	8,524866	3,220943	0,02310342
LOC283932	3	6,021133	7,706812	3,216918	0,002072
HS.561603	3	5,823234	7,507308	3,213343	0,00012775
HS.551538	3	8,528831	10,20813	3,202724	0,00230416
LY6G5B	3	5,662111	7,339463	3,198403	0,00759857
HS.400256	3	5,150994	6,81961	3,179094	0,0004062
SNX11	3	9,491923	11,1454	3,145906	0,01439742
FLJ40448	3	5,335139	6,987643	3,143787	0,00485492
ZFP36L2	3	6,409269	8,059634	3,139131	0,00260593
GDPD1	3	7,419719	9,065873	3,129982	0,00018224
SCNN1D	3	6,112756	7,758798	3,129739	0,01669056
ENAH	3	4,759647	6,400168	3,117784	0,00082063
SPRYD3	3	9,107843	10,74131	3,102572	0,00972877
LOC643556	3	4,959036	6,586181	3,08901	0,00537018
LOC729021	3	6,409521	8,028011	3,070536	0,00249586
METT10D	3	8,132406	9,745214	3,058465	0,00695372
VPS37D	3	9,5584	11,16375	3,042688	0,00230031
HS.171171	3	5,84089	7,443575	3,03708	0,00084443
DENR	3	10,03011	11,63169	3,034747	0,00108966
ZNF512B	3	7,925403	9,52144	3,023117	0,00390776
LOC400464	3	5,111643	6,70277	3,012846	0,00261476
C4ORF29	3	5,660686	7,245163	2,998991	0,00776498
ZNF431	3	5,885559	7,469927	2,998765	0,00303044
LRP3	3	11,30497	12,88669	2,993267	0,00432206
FOXD1	3	9,47784	11,0592	2,99251	0,00423763
CHST6	3	5,217094	6,797679	2,990911	0,00080276

C16ORF63	3	9,840409	11,42027	2,98941	0,00406221
ZFYVE20	3	10,78063	12,36035	2,989129	9,75E-05
LEMD2	3	9,166069	10,74554	2,988598	0,00853341
KLHDC3	3	11,80286	13,37828	2,980223	0,00515614
SGPP2	3	7,004304	8,567435	2,954946	0,00058512
ANKRD9	3	9,499978	11,06032	2,949234	0,00318334
FN3KRP	3	9,868101	11,42776	2,947837	0,00525002
AFF4	3	5,465313	7,023802	2,945451	0,00739102
NBPF3	3	6,315922	7,87296	2,942492	0,00291321
FUBP3	3	9,116004	10,66599	2,928148	0,04164351
C19ORF48	3	10,28556	11,83373	2,924464	0,02652008
AP3S2	3	8,330395	9,877383	2,922065	0,02726829
MEX3C	3	7,377454	8,911649	2,896267	0,03001839
LOC643505	3	6,442626	7,968052	2,878719	0,00112945
RNF24	3	7,461807	8,986482	2,877219	0,00499813
HS.28694	3	4,979435	6,50401	2,877019	0,00155101
DNAJC30	3	7,037973	8,561704	2,875336	0,00543335
NBPF14	3	6,782119	8,302541	2,868749	0,00698086
HS.19339	3	6,213123	7,713863	2,829879	0,01482173
FLJ22222	3	6,208443	7,706217	2,824067	0,01068822
GSDM1	3	6,28945	7,786742	2,823123	0,03189006
L2HGDH	3	8,819499	10,31344	2,816566	0,00011668
IPP	3	6,843768	8,337189	2,815557	0,0055521
TMEM194	3	8,360285	9,853699	2,815546	0,01059151
APAF1	3	7,113345	8,606543	2,815123	0,00062033
ST6GALNAC4	3	9,511806	10,99748	2,800469	0,01406179
NOP14	3	10,59948	12,08404	2,798319	0,01040114
SKA1	3	8,938838	10,42049	2,792686	0,00158057
MXD4	3	11,33014	12,81054	2,790255	0,00668788
STK4	3	10,13389	11,61081	2,783542	0,00015713

HS.573047	3	4,717482	6,190118	2,775285	0,0130053
ZNF517	3	6,129048	7,600378	2,772773	0,00953846
HS.20255	3	4,904373	6,37262	2,766854	0,00013164
ZNF346	3	7,219866	8,681385	2,753981	0,00106435
C16ORF58	3	10,81878	12,27961	2,752667	0,00599136
HS.545615	3	3,523284	4,978196	2,741398	0,00083976
HS.543138	3	4,553322	6,007089	2,739224	0,00043162
NUDT19	3	5,802332	7,252625	2,732635	0,00215231
TMEM109	3	11,76126	13,206	2,722136	0,02406599
MAGT1	3	10,47747	11,9209	2,719671	0,01009158
PPDPF	3	8,575289	10,01638	2,715262	0,0457688
ZNF621	3	7,535443	8,972717	2,708087	0,0002372
SHISA5	3	12,34114	13,77686	2,705171	0,00753105
HS.86045	3	6,127425	7,552273	2,684863	0,0336219
PCDHB19P	3	6,147264	7,570706	2,682246	0,02231103
PCDHB9	3	6,921558	8,342474	2,677554	0,010034
RRM2	3	7,484247	8,904915	2,677095	0,02645479
PBX3	3	10,4741	11,89203	2,672014	0,00678696
RXRA	3	9,206025	10,62002	2,664733	0,00133041
GLIPR2	3	10,16483	11,57821	2,663604	0,01147747
RPA4	3	4,644903	6,052926	2,653733	0,00061001
LOC644390	3	5,580172	6,987829	2,65306	0,0032365
ZNF789	3	6,716838	8,121137	2,646891	0,00746729
HS.105791	3	5,934413	7,333458	2,637271	0,00018861
NOL9	3	5,34567	6,739085	2,626997	0,01872817
SCD	3	11,52672	12,91717	2,621607	0,04533976
LOC645869	3	4,168535	5,555097	2,614547	0,03433141
RYK	3	9,25754	10,64397	2,61431	0,01552255
ZNF321	3	5,323041	6,707896	2,611457	0,00133579
GRM2	3	6,637622	8,021613	2,609893	0,02311698

PPM1F	3	11,27954	12,66317	2,609244	0,00533519
HS.121070	3	5,946307	7,325499	2,601225	0,00212511
CLN8	3	5,386659	6,765778	2,601094	0,00444475
PPIL1	3	9,738857	11,11091	2,58838	0,00616663
LONP2	3	7,634104	9,005209	2,586687	0,00160022
LOC729008	3	5,257749	6,626616	2,582676	0,00815004
LOC442582	3	5,224891	6,593594	2,582383	0,00517062
ZNF786	3	8,449055	9,817477	2,581882	0,01072396
C19ORF25	3	9,509596	10,87451	2,575602	0,03583644
ZSWIM6	3	7,049589	8,411764	2,570724	0,03803007
HS.133324	3	5,253341	6,615424	2,570561	0,00117695
HS.40289	3	4,896619	6,258004	2,569316	0,00305829
ANKRD43	3	7,189086	8,548362	2,565562	0,02758031
VOPP1	3	7,270338	8,62676	2,560493	0,02290595
RNF215	3	8,802092	10,15707	2,557938	0,00754219
HS.475334	3	9,34195	10,69537	2,555174	0,01018525
SCAMP5	3	8,993375	10,34569	2,553214	0,00602095
HS.553273	3	4,948585	6,300133	2,551858	0,00072224
ARF1	3	11,59342	12,94198	2,546567	0,00667524
DNAJC22	3	6,9329	8,280538	2,54495	0,00101567
PARD6G	3	6,105191	7,448736	2,537741	0,00108177
LOC653352	3	5,542371	6,885426	2,536879	0,00281271
GINS4	3	8,745412	10,08433	2,529615	0,00492303
FAM129B	3	9,271321	10,608	2,525688	0,00083715
ZNF320	3	5,382451	6,717743	2,523267	0,00919879
HES6	3	11,04987	12,3827	2,518964	0,00642726
LSM12	3	9,59881	10,93138	2,518502	0,025389
HS.349207	3	4,374322	5,705957	2,516878	0,0002894
PEX26	3	5,597536	6,928943	2,516479	0,00177491
ORMDL3	3	6,423664	7,755039	2,516424	0,0200856

UGCGL1	3	4,755383	6,081841	2,507862	0,00150457
SFXN5	3	8,170333	9,494678	2,504192	0,01528564
ATP6V0E2	3	12,60195	13,92438	2,500874	0,00702766

2.3 Validation de l'interaction en prométaphase entre Stau1 et certains ARNm codant pour des protéines du cycle cellulaire

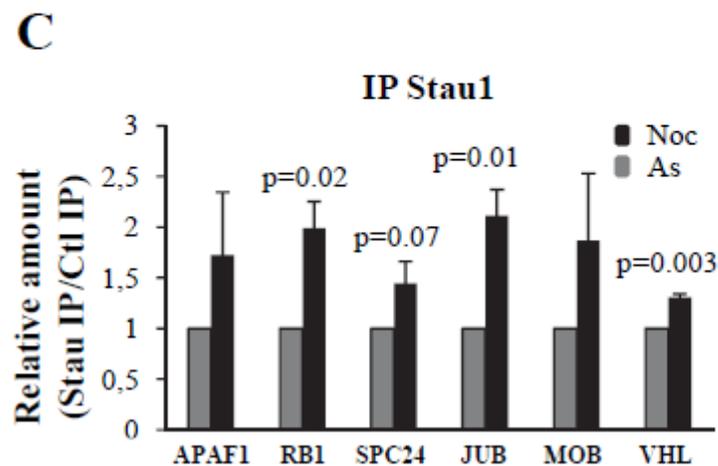
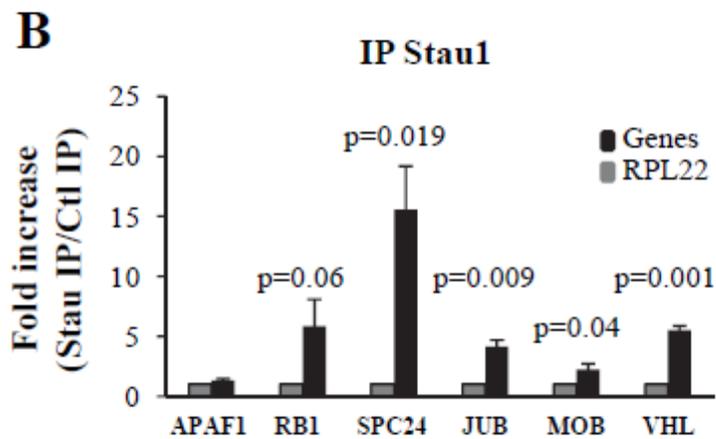
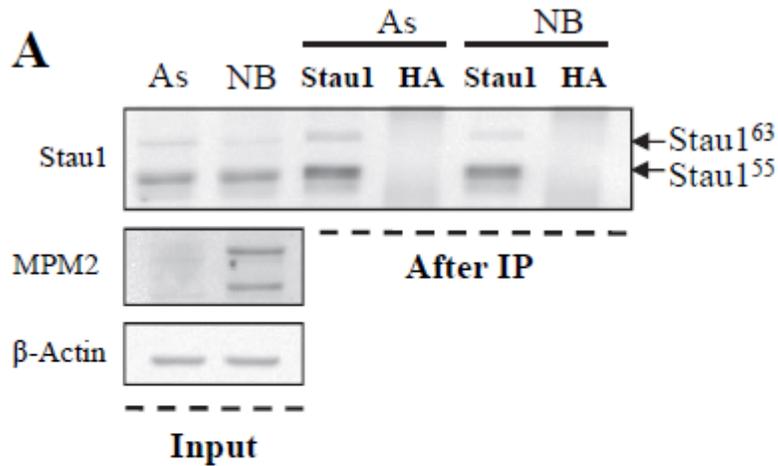
Afin de valider et de compléter l'information obtenue grâce à l'analyse des micropuces, nous avons étudié de plus près l'interaction entre Stau1 et certains ARNm codant pour des protéines généralement impliquées dans le cycle cellulaire, soit dans la progression de la mitose, ou encore dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les ARNm sélectionnés sont enrichis au moins deux fois dans les complexes immunoprécipités des cellules exprimant Stau1⁵⁵-FLAG, comparativement aux cellules contrôles, que ce soit dans des cellules synchronisées en prométaphase, ou dans des cellules asynchrones (Furic et al., 2008).

Nous avons donc sélectionné les ARNm codant pour APAF1, RB1 (pRb), SPC24, JUB, MOBKL2B et VHL. Tel que discuté dans des sections précédentes, APAF1 est le facteur responsable du déclenchement de l'apoptose, lors de son association avec le cytochrome c. RB1 est une protéine habituellement associée aux facteurs de transcription E2F et cette association détermine si les cellules peuvent entrer ou non dans la phase S du cycle cellulaire. RB1 est donc un des facteurs les plus importants spécifiant la capacité des cellules à proliférer. SPC24 est une des protéines faisant partie du complexe NDC80 du kinétochore, qui permet de faire le lien entre les centromères des chromatides et les microtubules du fuseau mitotique pendant la prométaphase. Le gène *JUB* code pour la protéine Ajuba, qui peut interagir avec les microtubules et les kinétochores pendant la mitose. Ajuba est aussi importante pour l'engagement de la cellule dans la phase mitotique étant donné son rôle activateur de la kinase Aurora A, dont le rôle est crucial dans la formation du fuseau mitotique et dans l'organisation des chromosomes sur celui-ci pendant la prométaphase. MOBKL2B code pour l'activateur 3b de la kinase MOB. Son rôle chez l'humain n'est pas très bien défini, mais son homologue chez la levure s'associe avec la kinase Mps1, importante dans la régulation du point de contrôle

mitotique. Enfin, VHL code pour le suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau, une enzyme ubiquitine ligase de type E3. Des mutations héréditaires existent dans ce gène et prédisposent les gens portant une de ces mutations à développer un cancer. La protéine non mutée peut notamment favoriser l'ubiquitination et la dégradation du facteur de transcription HIF (facteur inductible par l'hypoxie), qui est important dans la croissance tumorale. Comme contrôle, nous avons choisi d'employer l'ARNm codant pour RPL22, un ARNm abondant, puisqu'il code pour une protéine ribosomique. De plus, il n'est pas associé avec Stau1 selon les résultats de nos micropuces d'ADN.

Nous avons ainsi immunoprécipité Stau1 endogène et ses ARNm associés à partir d'extraits provenant soit de cellules HEK293T asynchrones ou de cellules HEK293T synchronisées en prométaphase avec du nocodazole. Comme contrôle, nous avons utilisé un anticorps reconnaissant l'épitope HA. La figure 38A montre l'expression de Stau1 dans les cellules asynchrones (As) et dans les cellules bloquées au nocodazole (NB) avant l'IP (Input), ainsi que l'expression de MPM2, marqueur de la prométaphase, dans les cellules synchronisées seulement. Aussi, cette figure indique que Stau1 a été immunoprécipitée à un niveau comparable dans les cellules asynchrones et synchronisées. Les ARNm immunoprécipités avec Stau1 dans les cellules synchronisées ont alors été purifiés et quantifiés par RT-qPCR. La quantité de chaque ARNm d'intérêt présent dans l'IP Stau1 a alors été évaluée par rapport à sa quantité dans l'IP contrôle, et ce ratio a alors été comparé à celui obtenu pour l'ARNm contrôle RPL22, afin de normaliser les résultats (Fig. 38B). Tous les ARNm analysés, sauf celui codant pour APAF1, ont bien été retrouvés enrichis d'au moins deux fois dans l'IP Stau1 par rapport à l'IP contrôle, comparativement au ratio obtenu pour RPL22 (Fig. 38B). Par la suite, nous avons comparé les ratios d'enrichissement de chaque ARNm avec Stau1 entre les cellules asynchrones (As) et les cellules bloquées en prométaphase (Noc) (Fig. 38C). Comme le montre la figure 38C, tous les ARNm étudiés se retrouvent préférentiellement associés à Stau1 dans les cellules en prométaphase, par rapport aux cellules asynchrones. Il semble que cette augmentation dans leur association ne soit pas due à une augmentation générale de leur niveau pendant la prométaphase, puisque l'expression de presque tous les ARNm analysés n'est pas significativement différente entre les cellules asynchrones et synchronisées, sauf dans le cas de JUB, dont le ratio Noc /As est de

1,38 fois plus grand que celui de RPL22 (Fig. 38D). Par conséquent, ces résultats évoquent qu'une augmentation de l'association de certains ARNm avec Stau1 pendant la prométaphase pourrait expliquer le rôle potentiel de Stau1 pendant la mitose, via la capacité de Stau1 à réguler posttranscriptionnellement leur expression ou leur localisation.



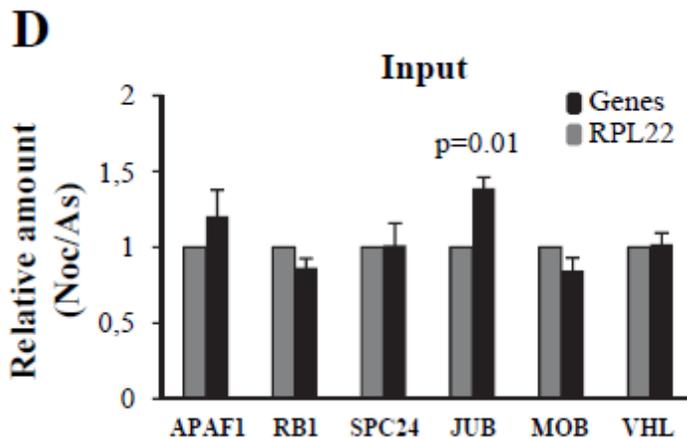


Figure 38. Validation par RT-qPCR de l'interaction entre Stau1 et certains ARNm sélectionnés.

A) Des cellules HEK293T ont été synchronisées en prométaphase avec du nocodazole (NB) ou laissées asynchrones (As). Stau1 et ses ARNm associés ont été immunoprécipités avec un anticorps reconnaissant la protéine endogène. Un anticorps reconnaissant l'épitope HA a été utilisé comme contrôle. L'expression des protéines Stau1, MPM2 et β -actine, comme contrôle de chargement, a été analysée par immunobuvardage de type Western (Input). L'immunoprécipitation de Stau1 a été vérifiée de la même façon (After IP). Résultats représentatif de trois expériences indépendantes.

B) Les ARNm coprécipités avec Stau1, ou présents dans l'IP contrôle, dans les cellules en prométaphase ont été isolés et analysés par RT-qPCR, en employant des amorces reconnaissant spécifiquement chacun des ARNm. Un ratio entre la quantité de chaque ARNm dans l'IP Stau1 comparativement avec l'IP contrôle a été calculé, puis normalisé par rapport au ratio obtenu pour l'ARNm contrôle, RPL22. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne de trois expériences indépendantes.

C) Les ARNm coprécipités avec Stau1, ou présents dans l'IP contrôle, dans les cellules asynchrones (As) et celles en prométaphase (Noc) ont été isolés et analysés par RT-qPCR, en employant des amorces reconnaissant spécifiquement chacun des ARNm. Un ratio entre la quantité de chaque ARNm dans l'IP Stau1 comparativement avec l'IP contrôle a été calculé, normalisé par rapport au ratio obtenu pour l'ARNm contrôle, RPL22, et comparé entre les

cellules asynchrones et les cellules bloquées avec du nocodazole. Les ratios obtenus pour les cellules asynchrones ont arbitrairement été définis à 1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne de trois expériences indépendantes.

D) L'ARNm total a été isolé des cellules traitées au nocodazole et des cellules asynchrones et analysé par RT-qPCR. Un ratio du niveau d'expression de chacun des ARNm a été calculé entre les cellules asynchrones et les cellules synchronisées, puis normalisé par rapport au ratio obtenu pour l'ARNm contrôle, RPL22. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne de trois expériences indépendantes.

Discussion

1. Stau2 et la réponse aux dommages à l'ADN

Ce chapitre de la discussion portera sur l'analyse des résultats présentés dans le premier chapitre de la section Résultats et sur les perspectives qui leur sont associées. Jamais auparavant Stau2 n'avait été reconnue comme une protéine régulée en réponse à des dommages à l'ADN. Par conséquent, l'accent sera mis ici sur la caractérisation de cette variation de l'expression de Stau2 à la suite d'un stress, pour tenter d'expliquer, du moins en partie, comment elle se produit et quels sont les facteurs qui la régulent. De plus, une analyse du rôle possible que pourrait jouer Stau2 dans la réponse aux dommages à l'ADN sera effectuée, en se basant sur les fonctions connues de Stau2 dans la régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes.

1.1 Caractérisation de la diminution de l'expression de Stau2 en réponse à un stress génotoxique

Dès les premiers essais que nous avons faits pour observer une possible variation de l'expression des protéines Staufen en réponse à des dommages à l'ADN, nous avons vite constaté une importante diminution de l'expression de Stau2. Plus précisément, nous avons observé une réduction de l'expression autant au niveau de la protéine que de l'ARNm de Stau2, comme présenté aux figures 24 et 25. Alors, nous avons voulu nous assurer que ce résultat ne se produisait pas seulement en conséquence de l'induction de l'apoptose à la suite des dommages à l'ADN (Fig. 26). De plus, nous nous sommes demandé si le traitement choisi, la CPT, n'était pas lui-même responsable de la diminution de l'expression de Stau2 (Fig. 27). Les figures 24 et 25 nous ont aussi permis de remarquer que l'expression de Stau1 n'est quant à elle pas affectée par un stress génotoxique, malgré ses caractéristiques communes avec Stau2. Enfin, les résultats obtenus à la figure 28 nous ont permis de constater que c'est la transcription de Stau2 qui semble principalement affectée lors du traitement à la CPT. Toutes ces questions seront abordées dans la présente section.

1.1.1 La diminution de l'expression de Stau2 par rapport à l'induction de l'apoptose

D'abord, il est important de préciser que nous avons délibérément choisi de comparer la variation de l'expression de Stau2 avec l'induction de l'apoptose, plutôt qu'avec un autre événement dans la cascade de la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, les conditions menant à l'apoptose dans les cellules HCT116 avec la CPT étant déjà bien caractérisées (Han et al., 2002), et l'apoptose étant la fin la plus souhaitable à un traitement contre le cancer, il a semblé logique de s'attarder d'abord sur cet événement. Nous avons ainsi noté la diminution de l'expression de Stau2 à la suite de traitements avec des doses plus ou moins importantes de CPT, certaines causant une réponse apoptotique, et certaines, non (Fig. 24). La première constatation ainsi faite de la déplétion de Stau2, même en présence de faibles doses ne faisant pas mourir la cellule, nous avons voulu confirmer cette observation en suivant l'expression de Stau2 dans le temps à la suite du traitement (Fig. 26). De cette façon, nous voulions nous assurer que la variation de l'expression de Stau2 n'était pas seulement une conséquence de l'induction de l'apoptose. Les résultats de la figure 26 sont donc importants puisqu'ils indiquent que la réduction de la quantité de Stau2 se produit avant que les caspases ne clivent PARP1, ce qui est particulièrement flagrant dans le cas de l'ARNm *stau2* dont l'expression est diminuée de 50% en moins de 4h30 de traitement.

Néanmoins, pour s'assurer que la protéine Stau2 elle-même n'est pas clivée par les caspases lors du déclenchement de l'apoptose, nous pourrions employer un inhibiteur général des caspases, comme le Z-VAD-FMK, en même temps que le traitement à la CPT. Étant donné nos résultats selon lesquels l'ARNm codant pour Stau2 est affecté par la drogue, et non pas seulement la protéine, et en fonction de l'absence de Stau2 dans la base de données CASBAH, indiquant les cibles des caspases (Luthi and Martin, 2007), nous pourrions nous attendre à ce que l'inhibiteur n'ait toutefois pas d'effet sur la variation de la quantité de Stau2. De plus, des résultats récemment obtenus dans notre laboratoire montrent que des traitements à la CPT dans d'autres types cellulaires, comme les HEK293T, moins sensibles à la CPT que les HCT116, engendrent toujours une diminution de l'expression de Stau2, même si la drogue ne cause pas d'apoptose dans ces cellules (résultats de X. Zhang, non présentés). Par

conséquent, la diminution de l'expression de *Stau2* semble être une réponse assez générale en réponse à un stress génotoxique, ce qui pourrait lui conférer un rôle assez large dans la réponse aux dommages à l'ADN. Cette question sera abordée un peu plus loin.

1.1.2 La diminution de l'expression de *Stau2* n'est pas une conséquence de l'utilisation de la CPT

Étant donné le mode de fonctionnement de la CPT en tant qu'inhibiteur de la topoisomérase I (section 1.2.2 de l'introduction), cette drogue est toxique dans les cellules en division surtout en raison de son effet sur la réplication de l'ADN. Cependant, la formation du complexe ternaire entre la CPT, l'ADN et topo I se répercute aussi sur la transcription générale dans la cellule (Collins et al., 2001). En conséquence, nous avons voulu savoir si la diminution de la quantité d'ARNm *stau2*, et de la protéine, n'était en fait due qu'à l'inhibition de la transcription causée par l'utilisation de la CPT. C'est pour cette raison que nous avons soumis les cellules HCT116 à divers autres traitements cytotoxiques (Fig. 27).

Les résultats obtenus à la suite de cette expérience se sont révélés plutôt intrigants. Effectivement, nous aurions pu nous attendre à ce que l'utilisation de la doxorubicine, un inhibiteur de la topoisomérase II, ait un effet similaire à celui de la CPT sur l'expression de *Stau2*, ce qui ne semble pas être le cas. En fait, les deux drogues agissent de façon similaire pour causer des dommages à l'ADN, c'est-à-dire en formant des complexes ternaires CPT-ADN-topo qui produisent alors des bris double brin dans l'ADN pendant la réplication et la transcription. Quelques différences semblent toutefois exister dans les modes d'action des deux drogues. Ainsi, la toxicité des inhibiteurs de topo II semble dépendre de façon plus importante sur la transcription pour la formation des cassures double brin, alors que la réplication est plus importante pour les inhibiteurs de topo I (Kurose et al., 2005; Pommier et al., 2010). Aussi, la formation des bris dans l'ADN semble découler en plus de la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) en ce qui concerne les inhibiteurs de topo II, ce qui n'est pas le cas pour les inhibiteurs de topo I (Huang et al., 2006; Pommier et al., 2010). Enfin, l'utilisation des deux types de drogues permet la phosphorylation de l'histone H2AX et l'activation des PIKK comme ATM. Cependant, les inhibiteurs de topo I affectent seulement

les cellules en phase S, ce qui justifie probablement pourquoi l'induction des dommages à l'ADN dépend surtout de la réplication en ce qui les concerne, alors que les inhibiteurs de topo II entraînent des dommages peu importe la phase du cycle cellulaire (Huang et al., 2006; Kurose et al., 2005). À première vue, il n'est donc pas évident de déterminer ce qui explique l'effet différent des deux drogues sur l'expression de *Stau2* et étant donné les grandes variations obtenues dans la quantification de l'ARNm *stau2* à la suite du traitement à la doxorubicine (Fig. 27), il ne faut pas écarter la possibilité qu'il y ait eu un défaut dans notre expérimentation.

En fin de compte, nous avons tout de même pu montrer que la diminution de l'expression de *Stau2* se produit aussi en réponse à d'autres traitements cytotoxiques. Ainsi, les résultats présentés à la figure 27 indiquent que le 5-fluoro-uracile (5FU), le MG132, les rayonnements UV et les irradiations ont sensiblement le même effet que la CPT. Le 5FU agit en inhibant la synthèse des nucléotides et en s'incorporant dans l'ADN, ce qui affecte directement sa réplication. Les UV aussi peuvent affecter la réplication de l'ADN. Ainsi, les agents qui affectent la réplication de l'ADN sont peut-être parmi les plus efficaces pour causer une diminution de l'expression de *Stau2*. Quant à elles, les irradiations peuvent causer directement des bris double brin dans l'ADN et semblent moins altérer l'expression de *Stau2*, bien que l'expérience soit à répéter. Finalement, le cas du MG132 est intéressant puisqu'il est habituellement employé pour inhiber le protéasome, mais il peut aussi engendrer une réponse apoptotique de diverses façons (Guo and Peng, 2013). Ainsi, il peut par exemple favoriser la formation de ROS, ce qui peut causer un mauvais fonctionnement de la mitochondrie et stimuler alors la relâche du cytochrome c. Il peut aussi induire la voie extrinsèque de l'apoptose (Guo and Peng, 2013). Bien que son mode d'action soit différent des autres agents étudiés, on observe tout de même une réduction de l'expression de *Stau2* après son utilisation. Les résultats présentés à la figure 27 montrent finalement que ce que ces différents agents ont le plus en commun est leur capacité à causer un stress assez sévère dans les cellules pour que celles-ci y répondent en activant la réponse la plus draconienne, l'apoptose.

Somme toute, nous avons réussi à montrer que la CPT n'est pas le seul agent à avoir un effet sur l'expression de *Stau2*, et donc que c'est un effet qui semble assez général à divers

types de stress. Par contre, notre étude ne s'est pas encore vraiment penchée sur la cascade d'événements qui se produit entre l'application de la drogue et la variation de l'expression de Stau2, sujet qui sera développé plus en détail un peu plus loin. Nous sommes alors en droit de nous demander si les différents stress entraînent une seule et même séquence d'événements ou s'ils sont chacun responsables d'une réponse unique qui mène en fin de compte à modifier l'expression de Stau2.

1.1.3 L'expression de Stau1 n'est pas affectée par un stress génotoxique

Les résultats présentés aux figures 24 et 25 nous ont d'abord paru surprenant, étant donné l'effet important de la CPT sur l'expression de Stau2 et l'absence complète d'effet sur l'expression de son paralogue Stau1. Les caractéristiques et fonctions de Stau1 et de Stau2 mises en évidence dans le chapitre 6 indiquent en effet que les deux protéines sont similaires à plusieurs niveaux, néanmoins, des différences existent entre les deux qui pourraient expliquer l'effet des dommages à l'ADN sur leurs niveaux d'expression respectifs.

D'abord, deux études différentes ont montré que Stau1 et Stau2 ne se retrouvent pas nécessairement dans de mêmes complexes RNP *in vivo* (Duchaine et al., 2002; Thomas et al., 2005). Ainsi, bien que les paralogues soient tous deux impliqués dans le transport de l'ARN, ils le font dans des complexes différents qui ne régulent potentiellement pas les mêmes fonctions. Par exemple, lorsque l'expression de Stau1 est supprimée dans des neurones, des défauts dans la plasticité synaptique à long terme (LTP) peuvent être observés, alors que la déplétion de l'expression de Stau2 mène plutôt à des défauts dans la dépression à long terme (LTD) dans ces mêmes neurones (Lebeau et al., 2008; Lebeau et al., 2011). De même, les résultats d'une étude à grande échelle effectuée dans notre laboratoire a révélé que les ARNm liés par Stau1 et par Stau2 sont majoritairement différents (Furic et al., 2008). En effet, 60% des ARNm associés à Stau1 ne le sont pas avec Stau2, alors que 75% des ARNm en complexe avec Stau2 ne le sont pas avec Stau1 (Furic et al., 2008). Il en découle donc que si Stau1 et Stau2 peuvent avoir des fonctions communes, comme le transport de l'ARN et la dégradation de l'ARN via le SMD, les ARNm qui sont régulés par ces mécanismes ont de grandes chances d'être différents. Par conséquent, nous pourrions faire l'hypothèse que Stau2 pourrait être important pour réguler un certain sous-ensemble de messagers codant pour des protéines

impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, alors que Stau1 pourrait jouer un rôle dans d'autres processus cellulaires, comme la progression du cycle cellulaire et la prolifération (Boulay et al., 2014).

Un autre aspect intéressant à développer dans une étude subséquente pourrait porter sur la régulation différentielle de Stau1 et de Stau2 en réponse à des dommages à l'ADN. Nos résultats montrent déjà que Stau2 est principalement affecté au niveau de sa transcription, probablement via l'implication du facteur de transcription E2F1, (Fig. 28 à 34) et aussi que l'expression de Stau1 peut également être stimulée par E2F1 (résultats non présentés). Conséquemment, il est possible que la présence d'E2F1 sur les promoteurs de Stau1 et Stau2 ne soit pas affectée de la même façon en réponse à des dommages à l'ADN.

1.1.4 L'expression de Stau2 est affectée au niveau de la transcription en réponse à la CPT

Après avoir observé la diminution d'expression de Stau2 à la suite du traitement génotoxique, nous nous sommes bien entendu demandé comment cette variation dans la quantité de Stau2 se produisait. Puisque l'expression de l'ARNm codant pour Stau2 diminue de façon considérable en réponse à la CPT (Fig. 25 et 26), nous avons appliqué nos efforts à montrer que c'est l'ARNm qui est affecté. Cependant, nos résultats actuels ne nous permettent pas de mettre de côté la possibilité que la stabilité de la protéine soit aussi modulée à la suite du traitement. Pour évaluer cette possibilité, nous pourrions réaliser une expérience similaire à celle dont les résultats sont présentés à la figure 26, donc en suivant la diminution de l'expression de Stau2 dans le temps à la suite d'un traitement à la CPT, mais en ajoutant en plus du MG132 au préalable afin d'inhiber la dégradation possible de la protéine via le protéasome. Ainsi, si la réduction observée de l'expression de Stau2 est la même avec et sans MG132, nous pourrions conclure que la protéine n'est pas dégradée par le protéasome en réponse à un stress génotoxique et que c'est effectivement seulement l'ARNm qui est touché. Une autre expérience possible consisterait à faire une cinétique après avoir inhibé la traduction dans les cellules HCT116 pour analyser la demi-vie de Stau2 dans ces cellules et la comparer avec la diminution de l'expression de Stau2 après le traitement à la CPT pour observer si le

même résultat est obtenu. Nous pourrions ainsi vérifier si la diminution de la quantité de Stau2 correspond à la demi-vie de la protéine endogène, ce qui signifierait donc que le niveau de la protéine n'est pas dérangé par les dommages à l'ADN.

Étant donné que la quantité d'ARNm *stau2* diminue toutefois avant que la quantité de la protéine soit affectée (Fig. 26), nos résultats suggèrent que la modulation de l'expression de Stau2 se produit principalement grâce à un mécanisme régulant l'expression au niveau de l'ARNm. Nous souhaitons alors pouvoir faire la distinction entre un mécanisme de dégradation de l'ARN et un autre ayant plutôt un impact sur la transcription. Pour ce faire, nous avons employé un vecteur permettant l'expression de l'ARNm codant pour l'isoforme de Stau2 de 59 kDa. Évidemment, quatre isoformes de Stau2 existent, mais puisque nos résultats semblent indiquer que l'expression de tous les isoformes est affectée de façon similaire (Fig. 24 et 26), nous avons décidé de nous concentrer sur l'expression d'un seul de ces isoformes. Une expérience intéressante qui pourrait être réalisée serait de concevoir des amorces de qPCR pouvant reconnaître chacun des isoformes individuellement et analyser leur variation en réponse à la CPT. Ceci devrait être possible puisque les ARNm qui codent pour les différents isoformes possèdent certaines régions qui leur sont propres. Pour l'instant, les résultats concernant l'ARNm de Stau2 présentés dans cette thèse ont tous été obtenus grâce à des réactions de qPCR effectuées avec des amorces reconnaissant tous les isoformes de Stau2 en même temps.

Ainsi, nous avons exprimé dans les cellules HCT116 l'ARNm codant pour Stau2⁵⁹, tout en incluant les séquences 5'UTR et 3'UTR, puisque les régions régulant la stabilité d'un ARNm se retrouvent généralement dans ces séquences. La figure 28 montre donc que l'expression de Stau2⁵⁹-FLAG₃ (S2F) ne varie pas en réponse à la CPT, ni au niveau de la protéine, ni au niveau de l'ARNm, contrairement à la protéine et à l'ARNm endogènes. Ces résultats suggèrent donc que la stabilité de l'ARNm codant pour Stau2 n'est pas modifiée par le stress génotoxique. Par conséquent, ils indiquent que la présence du promoteur CMV régulant l'expression de S2F n'a pas pu permettre d'observer la diminution de l'expression de Stau2 détectée lorsque c'est son promoteur natif qui la régule. Le seul bémol que nous pourrions apporter est qu'il manque environ le tiers du 5'UTR dans notre construction S2F,

bien qu'il soit de petite taille comparativement à son 3'UTR. Donc si une région régulatrice est présente sur cette séquence, nous n'aurions pas pu évaluer son effet en employant S2F.

Il faut noter que ces résultats ne montrent pas directement l'implication d'un processus d'inhibition de la transcription dans la réduction de l'expression de Stau2, plutôt l'absence de régulation de la stabilité de son ARNm. Notre expérience se compare en fait à une expérience réalisée préalablement pour montrer l'effet de répression transcriptionnelle du gène codant pour Mcl-1, un membre antiapoptotique de la famille Bcl-2, par E2F1 (Croxtton et al., 2002). E2F1 peut directement réprimer l'expression de Mcl-1 en réponse à un stress ou lors de sa surexpression, mais, dans ce cas, l'expression de Mcl-1 exogène, stimulée par un promoteur CMV, est tout de même un peu affectée par la surexpression d'E2F1. Ce résultat a donc amené les auteurs à conclure qu'un mécanisme de régulation posttranscriptionnelle pouvait aussi moduler l'expression de Mcl-1, en plus de la répression transcriptionnelle (Croxtton et al., 2002). Nos résultats discutés ici, et ceux présentés à partir de la figure 30, semblent plutôt impliquer que la régulation de la transcription de Stau2 constitue l'explication la plus importante de l'effet de la CPT sur son expression.

1.2 Régulation de la transcription de Stau2 en réponse aux dommages à l'ADN

Après avoir défini la régulation de la transcription de Stau2 comme la raison la plus probable de la diminution de son expression à la suite d'un traitement à la CPT (Fig. 28), notre attention s'est portée sur la caractérisation du promoteur putatif de Stau2, celui-ci n'ayant pas du tout été analysé auparavant (Fig. 29). Notre étude du promoteur putatif de Stau2 nous a permis de confirmer son rôle dans la modulation de l'expression de Stau2 en réponse à un stress, ainsi que l'identification d'une région minimale impliquée dans ce processus, région qui reste tout de même à préciser encore plus (Fig. 30 et 31). Ensuite, nous avons fait l'hypothèse que le facteur de transcription E2F1 pourrait jouer un rôle dans la transcription de Stau2, ce que nous avons alors vérifié (Fig. 32). Aussi, nos résultats suggèrent que l'effet activateur d'E2F1 pourrait être annulé par le traitement à la CPT (Fig. 33 et 34), et ceci sera approfondi dans cette section. Enfin, certaines hypothèses seront posées concernant le rôle de

possibles modifications posttraductionnelles de facteurs impliqués dans le contrôle de la transcription de *Stau2* en réponse aux dommages à l'ADN.

1.2.1 Identification du promoteur putatif de *Stau2* et d'une région importante pour sa régulation

Comme la région promotrice de *Stau2* n'a jamais été identifiée et caractérisée, nous avons dû faire un peu de défrichage avant de pouvoir déterminer si les dommages à l'ADN affectent bien l'expression de *Stau2* via une régulation transcriptionnelle. Ainsi, l'analyse dans GenBank des séquences des transcrits codant pour *Stau2* nous a révélé qu'il existe sept messagers alternatifs transcrits à partir du gène *Stau2*. Un transcrit code pour chacun des isoformes de 56, 59 et 62 kDa, trois messagers différents codent pour l'isoforme de 52 kDa, et un transcrit code supposément pour un isoforme de 44 kDa, une protéine qui n'est généralement pas observée. Six de ces sept transcrits débutent avec un exon commun, soit un exon de 145 paires de bases. Un des messagers codant pour *Stau2*⁵² commence avec un exon différent, plus en amont dans la séquence génomique. Nous avons donc décidé d'analyser la région génomique autour du site d'initiation de la transcription de la majorité des ARNm, puisque les quatre isoformes connus de *Stau2* peuvent être obtenus lorsque la transcription débute à ce site.

La principale constatation que nous avons faite en évaluant cette séquence est la présence d'une région de presque 600 paires de bases contenant près de 95% de G et de C autour du site d'initiation prédit, environ 500 paires de bases en amont et 100 paires de bases en aval (Fig. 29). Ceci n'est pas vraiment surprenant étant donné que de très nombreux promoteurs dans le génome humain sont constitués de la même manière. En effet, 72% des promoteurs humains contiennent une proportion élevée d'îlots CpG (Saxonov et al., 2006). Néanmoins, cette forte teneur en GC a rendu l'amplification de cette région très difficile et nous l'avons finalement obtenue en digérant un clone BAC par des enzymes de restrictions. De cette façon, nous avons isolé une région comprenant les 4033 paires de bases en amont du site prédit d'initiation de la transcription et 197 paires de bases en aval, incluant la séquence complète du premier exon de 145 paires de bases (Fig. 29). Nous avons alors employé la

méthode classique de délétions dans cette séquence pour analyser sa capacité à stimuler la transcription d'un gène rapporteur. Les essais luciférase dont les résultats sont présentés à la figure 29 montrent que c'est effectivement le cas. De plus, ils indiquent entre autres que si la région riche en GC est supprimée, la transcription de la luciférase est abolie, ce qui suggère l'importance de cette région dans la régulation transcriptionnelle de Stau2. Bien sûr, cette région semble être reconnue par les facteurs de transcription de base (Consortium, 2011), ce qui représente l'explication la plus simple pour l'absence d'induction de luciférase. L'autre observation intéressante que nous pouvons faire est que plus la région en amont du site d'initiation, comprenant au moins une partie de la région riche en GC, est courte, meilleure est l'activation de la luciférase (Fig. 29). De même, la délétion -195 est plus active que la délétion -1250 et cette dernière est plus active que la région de 4033 paires de bases au complet. D'abord, il est possible que la longueur du plasmide ait joué un rôle, particulièrement, entre la construction Stau2 complète et les deux délétions. Ainsi, la transfection d'un plasmide de 9 kB a possiblement été moins efficace que celle d'un plasmide de 6 kB ou moins. D'un autre côté, il est possible que la délétion -195 soit effectivement la plus efficace dans l'activation transcriptionnelle, par exemple si elle contient le plus d'éléments de réponse pour des activateurs. Il est aussi possible que des sites dans le promoteur distal de Stau2 soient reconnus par des répresseurs transcriptionnels et que ce soit cela qui explique les différences observées dans les niveaux de luciférase. Comme il en sera discuté dans la prochaine section, nous n'en sommes encore qu'au commencement de l'exploration du promoteur de Stau2 et de ses facteurs régulateurs.

Il est important de noter que cette expérience n'a malheureusement pas été répétée dans les cellules HEK293T, comme à la figure 29, mais les niveaux d'expression des constructions du promoteur de Stau2 ont aussi été comparés à la figure 31, qui rapporte les résultats d'essais luciférase effectués dans des HCT116, les cellules principalement employées dans notre étude. De ce fait, la figure 31 montre que la délétion -195 semble encore une fois un meilleur inducteur de la luciférase que la région -4033, mais ne permet pas sans aucun doute de dire si c'est en raison d'un meilleur taux de transfection ou en raison d'une réelle activation transcriptionnelle plus efficace. Cependant, la figure 31 montre également que la délétion de la majorité de la séquence en aval du site d'initiation de la transcription, pour

obtenir la délétion que nous avons nommée -195*, empêche une induction du rapporteur aussi fructueuse que lorsque cette région est présente. En fait, une recherche dans l'Encyclopédie des Éléments d'ADN (ENCODE) indique que des facteurs de transcription de base, et plusieurs autres facteurs, semblent reconnaître la région génomique couverte par le premier exon de *STAU2* (Consortium, 2011). De la même façon, la délétion -68* est encore moins efficace pour stimuler la transcription de la luciférase et nous avons même dû comparer son induction de l'expression avec celle du vecteur pGL3 basic, codant pour la luciférase mais ne contenant pas de séquence promotrice stimulant son expression (Fig. 31D). Nous avons de la sorte observé que -68* soutient un peu d'expression du rapporteur, mais il est clair qu'il est beaucoup moins efficace que la délétion -195, et même -195*, ce qui suggère que la délétion de la région entre les nucléotides -195 et -68 enlève d'importants sites activateurs de la transcription de *Stau2*.

Bien sûr, la question qui nous intéresse tout particulièrement est d'identifier une région permettant de réguler l'expression de *Stau2* en réponse à des dommages à l'ADN. Nous avons donc réalisé des essais luciférase après avoir transfecté les vecteurs contenant les délétions présentées aux figures 29 et 31 et traité les cellules HCT116 avec la CPT. La figure 30 montre ainsi que peu importe leurs niveaux respectifs d'induction de la luciférase, la région « *Stau2* » et les délétions -1250 et -195 assurent une diminution similaire de l'expression en réponse à la CPT. Une question qui se pose ici est de savoir si la diminution d'environ 50% du taux de transcription de la luciférase obtenue dans cette expérience est suffisante pour expliquer une réduction de la quantité d'ARNm endogène de *Stau2* de 70% à 80% observée dans des expériences précédentes en réponse à une même dose de CPT (Fig. 24 et 28). Nous avons bien tenté d'analyser le niveau de l'ARNm codant pour la luciférase en présence et en absence de traitement, mais divers problèmes techniques nous ont empêchés de produire des résultats probants. Nonobstant, la question demeure pertinente pour une étude future. Il faut toutefois préciser que les résultats de la figure 30 ont été obtenus après avoir transfecté nos vecteurs pGL3 contenant les diverses délétions dans les cellules. Par conséquent, il est possible que le mécanisme de diminution de la transcription de la luciférase soit un peu saturé par rapport au même mécanisme qui contrôle la réduction endogène de l'expression de *Stau2*.

Enfin, les résultats de la figure 31, plus particulièrement la comparaison entre les ratios observés pour les délétions -195 et -195*, indiquent que la délétion de la majeure partie de la séquence en aval du site d'initiation de la transcription, bien qu'elle affecte le niveau d'induction de la luciférase, ne fait pas de différence dans la réponse à la CPT. Ceci suggère en conséquence que la séquence de 195 paires de bases tout de suite en amont du site d'initiation est responsable de la variation d'expression de *Stau2* à la suite d'un stress génotoxique. Si une délétion supplémentaire est faite, pour obtenir la délétion -68*, la situation n'est alors plus la même. Nos résultats ne sont pas tout à fait concluants sur ce point, et l'expérience est à répéter, mais tout porte à croire que la délétion -68* est moins affectée par la CPT que -195* (Fig. 31). Somme toute, nous pouvons conclure de ces résultats que la région située entre les nucléotides -195 et -68 en amont du site d'initiation de la transcription de la majorité des isoformes de *Stau2* est essentielle pour garantir une diminution de l'expression en réponse à la CPT. En ce moment, notre laboratoire en est à évaluer d'autres délétions entre les nucléotides -195 et -68 pour vérifier leur réponse à la CPT, ainsi que celle de mutants ponctuels dans cette région riche en GC. Certains de ces mutants ponctuels ont d'ailleurs été conçus après que nous ayons réalisé l'importance que pourrait avoir le facteur de transcription E2F1 dans la régulation de la transcription de *Stau2*.

1.2.2 Le facteur de transcription E2F1 est important dans le contrôle de la transcription de *Stau2*

Lorsque les sujets de la régulation de la transcription et de la réponse aux dommages à l'ADN sont abordés ensemble, le premier régulateur auquel on pense est évidemment le facteur de transcription p53. Certaines évidences suggèrent par contre que *Stau2* n'est pas une cible de p53. Les gènes cibles de p53 sont étudiés depuis longtemps étant donné le rôle prépondérant de ce facteur comme suppresseur de tumeur et *STAU2* n'a jamais été révélé comme étant une de ses cibles (Riley et al., 2008). De plus, certains résultats préliminaires de notre laboratoire indiquent qu'un traitement à la CPT dans des cellules HCT116 dans lesquelles l'expression de p53 a été abolie permet une diminution de l'expression de *Stau2* comparable à celle obtenue dans des cellules HCT116 sauvages (résultats non présentés). Néanmoins, un autre facteur de transcription activé lors de dommages à l'ADN est E2F1, tel

qu'exposé dans la section 4.2 de l'introduction. Une étude de ChIP-Séq a aussi permis de montrer qu'E2F1 peut s'associer avec un motif riche en GC dans le promoteur de base de plusieurs gènes (Cao et al., 2011). Comme discuté ci-dessus, le promoteur putatif de *Stau2* contient une large région riche en GC qui couvre ce qu'on pourrait considérer comme le promoteur de base, autour du site prédit d'initiation de la transcription. De plus, les données du projet ENCODE nous permettent de constater qu'E2F1 peut effectivement s'associer avec cette région du promoteur de *Stau2* (Consortium, 2011). En conséquence, nous avons fait l'hypothèse qu'E2F1 pouvait réguler la transcription de *Stau2* et possiblement même contrôler sa transcription en réponse à des dommages à l'ADN.

Nous avons d'abord supposé qu'E2F1 pourrait agir en tant que répresseur transcriptionnel sur le promoteur de *STAU2*, puisque nous observons une diminution de l'expression de *Stau2* en réponse à des dommages à l'ADN. Par exemple, nous avons imaginé que la relation entre la transcription de *Stau2* et E2F1 pourrait ressembler à celle qui se produit lors de la régulation de la transcription du gène *GRP78* par E2F1 en réponse à un stress du réticulum endoplasmique. Dans ce cas, E2F1 est activé par le stress et assure le déplacement du facteur activateur Sp1, qui s'associe aussi à des motifs riches en GC, du promoteur de *GRP78* et sa liaison permet ainsi de réprimer l'expression de *GRP78*, une protéine impliquée dans le repliement des protéines (Racek et al., 2008). Pour valider notre hypothèse, nous avons donc infecté les cellules HCT116 avec des virus exprimant les protéines chimères HA-ER et HA-ER-E2F1, dans lesquelles ER représente le récepteur des œstrogènes. Nous avons donc créé deux lignées exprimant ces deux chimères de façon stable. En fait, l'activation d'E2F1 dans ces protéines est régulée par l'ajout de 4-hydroxytamoxifène (OHT), qui lie ER et permet la translocation des chimères dans le noyau (Putzer et al., 2000). De cette façon, même si les cellules expriment HA-ER-E2F1, elles ont besoin d'OHT pour qu'E2F1 puisse réellement être activé. Cette méthode permet donc de simuler ce qui se produit généralement en réponse à un stress génotoxique en ce qui a trait à l'activation d'E2F1. Il est d'ailleurs intéressant d'observer que la surexpression et l'activation d'E2F1 en employant cette façon de faire peuvent elles-mêmes causer une certaine réponse apoptotique par rapport aux cellules HA-ER contrôles (Fig. 33A). Ce résultat n'est pas surprenant si nous considérons la capacité d'E2F1

d'activer la transcription de cibles proapoptotiques et d'inhiber celle de cibles antiapoptotiques (section 4.2.2 de l'introduction).

La figure 32 montre les résultats obtenus après avoir analysé la quantité d'ARNm codant pour *Stau2* dans nos lignées exprimant stablement HA-ER ou HA-ER-E2F1, soit en absence, soit en présence d'OHT. Nous avons aussi évalué la quantité d'ARNm observée pour certains contrôles, dont *p73* et *APAF1*, dont E2F1 active directement l'expression en réponse à un stress, et aussi *GRP78*. Nous n'observons qu'une faible diminution de la quantité d'ARNm codant pour *GRP78* dans les cellules exprimant HA-ER-E2F1 traitées avec l'OHT, mais il est clair que ce n'est pas ce qui se produit pour *Stau2* (Fig. 32). En effet, nous pouvons observer une augmentation du niveau de *stau2* de presque quatre fois lors de l'activation d'E2F1, augmentation qui est comparable à celle obtenue pour *apaf1* et *p73*. Par conséquent, nous avons pu montrer, pour la première fois, que l'expression de *Stau2* est stimulée par E2F1, contrairement à ce à quoi nous aurions d'abord pu nous attendre. La figure 33 montre à nouveau l'augmentation de la quantité d'ARNm codant pour *Stau2* lors de l'activation d'E2F1, et montre que les quatre isoformes protéiques sont aussi exprimés plus fortement dans les cellules HA-ER-E2F1 (avec OHT, mais sans CPT). De plus, une expérience un peu différente nous amène à une même conclusion. Ainsi, la transfection de la portion active du promoteur de *Stau2* (délétion -195) dans les deux lignées stables permet d'observer une meilleure expression du gène rapporteur luciférase lorsqu'E2F1 est déplacé au noyau dans les cellules HA-ER-E2F1 (Fig. 34). L'augmentation n'est pas aussi considérable que l'augmentation de l'ARNm endogène de *Stau2* (Fig. 32), mais le fait que les deux expériences donnent des résultats qui pointent dans la même direction est encourageant. Aussi, il est possible que des sites supplémentaires permettant la liaison d'E2F1 se retrouvent sur le promoteur de *Stau2*, mais qu'ils ne soient pas présents sur la délétion -195, qui ne contient d'ailleurs pas toute la région riche en GC.

Ces résultats suggèrent donc qu'E2F1 doit avoir la capacité de s'associer au promoteur régulant l'expression de *Stau2*, et pour le montrer d'une façon encore plus définitive, nous pourrions avoir recours à la technique d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Déjà, nos résultats signalent que les 195 paires de bases en amont du site d'initiation et les 197 paires de

bases en aval, qui font partie de la délétion -195, doivent contenir au moins un élément de réponse reconnu par E2F1 (Fig. 34). Cette région pourrait donc d'abord être employée comme cible pour le CHIP. Tel que discuté dans la section précédente, nous souhaitons également évaluer l'effet de mutations ponctuelles dans cette séquence de la région riche en GC, dans le but entre autres de déterminer quel site ou quels sites sont reconnus par E2F1, ce dont, pour l'instant, nous n'avons pas une idée précise.

Notre focus sur E2F1, pour l'instant, n'empêche pas que d'autres facteurs puissent être importants dans la régulation transcriptionnelle de Stau2. Certains autres facteurs identifiés à l'aide d'ENCODE sont mentionnés dans la section 1.8 des résultats. Un de ces facteurs, particulièrement intéressant, est Yin Yang 1 (YY1), qui semble reconnaître une région similaire à celle reconnue par E2F1 (Consortium, 2011). YY1 peut à la fois initier, activer et réprimer la transcription de ses gènes cibles (Castellano et al., 2009; Gordon et al., 2006). De plus, YY1 peut agir en coopération avec E2F1 pour contrôler l'expression de certains gènes (Wu et al., 2008). Plusieurs observations évoquent également que sa surexpression, ou sa trop grande activation, peut être à l'origine d'une prolifération cellulaire anormale, de la tumorigenèse et de la résistance à des traitements chimiothérapeutiques (Castellano et al., 2009; Gordon et al., 2006). En conséquence, il serait intéressant d'étudier si YY1 peut s'associer au promoteur de Stau2, et si oui, comment il influence son expression et s'il le fait en collaboration avec E2F1, ou plutôt en entrant en compétition avec ce facteur pour un même site d'association sur le promoteur de Stau2.

1.2.3 Lien entre les dommages à l'ADN, E2F1 et la régulation de la transcription de Stau2

Après avoir fait la constatation de l'effet activateur d'E2F1 sur l'expression de Stau2, nous avons fait l'hypothèse que les dommages à l'ADN, via le traitement à la CPT, pourraient empêcher E2F1 de jouer son rôle d'activateur transcriptionnel de Stau2. Ceci pourrait alors expliquer la diminution de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT. Pour valider notre hypothèse, nous avons traité les lignées HA-ER et HA-ER-E2F1 avec la CPT (Fig. 33) et vérifié son effet sur l'expression de Stau2 dans ces cellules. La figure 33 montre ainsi que

l'ajout de la CPT annule presque complètement l'augmentation de la quantité de la protéine Stau2 observée dans les cellules HA-ER-E2F1 (Fig. 33A), observation qui est encore plus frappante lorsque c'est le niveau d'ARNm codant pour Stau2 qui est analysé (Fig. 33B). Un résultat similaire est obtenu lorsque la délétion -195 est transfectée dans les cellules HA-ER-E2F1, que celles-ci sont traitées à la CPT et que l'expression de la luciférase est mesurée (Fig. 34), bien que ce dernier résultat soit un peu moins concluant. Néanmoins, les résultats obtenus nous permettent de suggérer certains mécanismes qui pourraient expliquer comment l'activation de *STAU2* par E2F1 pourrait être inhibée en réponse à un stress génotoxique et qui pourraient faire l'objet d'études futures.

Essentiellement, nous pourrions envisager deux mécanismes différents qui pourraient justifier les résultats présentés aux figures 33 et 34. D'un côté, E2F1 agirait en tant qu'activateur transcriptionnel de Stau2 en absence de stress, et lors de dommages à l'ADN, E2F1 serait déplacé du promoteur de Stau2 afin qu'un ou plusieurs facteurs inhibiteurs s'associent au même site sur l'ADN. D'un autre côté, E2F1 pourrait rester associée au promoteur de Stau2 et des modifications posttraductionnelles sur E2F1 pourraient par exemple favoriser le recrutement de cofacteurs répresseurs de la traduction. Évidemment, la façon la plus simple de différencier entre les deux possibilités serait de faire des CHIP pour comparer les niveaux d'E2F1 sur le promoteur de Stau2 en absence et en présence d'un traitement à la CPT. Cependant, il n'est pas impossible qu'E2F1 puisse se lier à plusieurs sites sur le promoteur de Stau2 et ainsi qu'une combinaison des deux mécanismes puisse être observée. Pour l'instant, comme nous ne connaissons pas encore le niveau d'occupation du promoteur de Stau2 par E2F1 avant et après des dommages à l'ADN, nous ne pouvons que poser certaines hypothèses pour tenter d'expliquer ce qui se produit en réalité. De plus, nous ne devons pas oublier que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de Stau2 en réponse aux dommages à l'ADN. Par exemple, il a été montré que l'utilisation de diverses drogues chimiothérapeutiques inhibe l'expression et l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription YY1 (Baritaki et al., 2007). Ainsi, si YY1 est capable d'activer la transcription de Stau2, son inhibition serait une manière de réguler son expression à la baisse. Cependant, comme nos résultats se concentrent plutôt sur le rôle d'E2F1 pour le moment, son implication sera discutée plus en détail ici.

Comme mentionné, une première possibilité permettant d'expliquer comment la CPT pourrait empêcher E2F1 de réguler positivement l'expression de Stau2 serait en inhibant son association avec le promoteur de Stau2. E2F1 ne s'associe pas seul avec l'ADN, il le fait généralement avec un partenaire protéine de la famille DP. Récemment, une étude a montré que la protéine DP4 est induite par un stress génotoxique et qu'elle peut entrer en compétition avec DP1 pour s'associer avec E2F1 (Ingram et al., 2011). De cette façon, le complexe E2F1/DP4 ne peut interagir avec l'ADN et empêche la transcription à des sites habituellement régulés par E2F1 (Ingram et al., 2011). Par conséquent, la possibilité de l'interaction entre E2F1 et DP4 serait une avenue intéressante à explorer pour éventuellement justifier la diminution d'expression de Stau2 en réponse aux dommages à l'ADN. Aussi, ENCODE indique que deux autres facteurs E2F peuvent interagir avec la même région du promoteur de Stau2 qu'E2F1, soit E2F4 et E2F6, deux facteurs répresseurs de la famille (Consortium, 2011). Les fonctions d'E2F4 et d'E2F6 en réponse aux dommages à l'ADN ne sont pas bien caractérisées, bien que certaines évidences montrent que les niveaux d'E2F4 sont réduits en réponse à des drogues génotoxiques (Ma et al., 2004), ce qui n'en ferait vraisemblablement pas un bon candidat pour réprimer l'expression de Stau2. E2F6 pourrait alors agir comme répresseur transcriptionnel en s'associant avec le promoteur de Stau2 en déplaçant l'activateur E2F1.

En second lieu, l'autre option à considérer pour justifier l'inhibition de l'activation transcriptionnelle de Stau2 par E2F1 en réponse aux dommages est qu'E2F1 pourrait toujours s'associer avec le promoteur, mais que des facteurs répresseurs pourraient être recrutés pour empêcher la transcription. Notamment, E2F1 peut interagir avec TopBP1 sur les promoteurs de ses gènes cibles, ce qui favorise le recrutement de Brg1/Brm, un composant essentiel du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Liu et al., 2004). Cette interaction sert normalement à réprimer l'activité transcriptionnelle d'E2F1 afin d'inhiber sa fonction proapoptotique (Liu et al., 2004), mais il n'est pas difficile d'imaginer qu'un mécanisme semblable pourrait exister lorsque cette activité proapoptotique d'E2F1 est nécessaire, comme en réponse à des dommages à l'ADN. De même, l'interaction entre pRB et E2F1 peut être affectée de plusieurs façons en réponse à un stress génotoxique (section 4.2.1 de l'introduction). Par exemple, pRB peut être phosphorylée par Chk1/2 en réponse à des

dommages à l'ADN, ce qui renforce l'interaction entre pRB et E2F1, et ainsi, favorise la répression transcriptionnelle de gènes cibles d'E2F1 (Inoue et al., 2007). Une telle augmentation de l'interaction entre pRB et E2F1 sur le promoteur de Stau2 pourrait donc être envisageable.

En fait, l'importance des modifications posttraductionnelles dans le contrôle de l'expression de Stau2 n'est pas un aspect à négliger. Effectivement, ce type de modifications représente la première ligne de réponse à la suite d'un traitement avec une drogue génotoxique. Les kinases ATM/ATR et Chk1/2 sont bien sûr responsables de nombreux événements de phosphorylation, et il existe d'autres modifications comme l'acétylation et l'ubiquitination, aussi très courantes. Les modifications posttraductionnelles d'E2F1 en réponse à des dommages à l'ADN qui sont connues jusqu'à maintenant sont surtout responsables de la stabilisation de la protéine (Fig. 18). Il n'est pas impossible par contre que certaines de ces modifications, ou des modifications supplémentaires, soient en plus impliquées dans le recrutement de cofacteurs pour contrôler la transcription, comme dans le cas de p53 (Gu and Zhu, 2012). Néanmoins, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire indiquent que l'inhibition des kinases ATM/ATR, ainsi que Chk1/2, n'empêche pas la diminution de l'expression de Stau2 en réponse à un traitement à la CPT (résultats non présentés), ce qui suggérerait que les facteurs qui régulent l'expression de Stau2 n'ont pas besoin d'être phosphorylés par ces kinases. Toutefois, l'effet d'autres kinases activées en réponse à un stress, comme des kinases de la famille des MAP kinases (p38 MAPK, MAPKAP2 ou MK2), n'a pas encore été évalué.

Un autre aspect de l'induction de modifications posttraductionnelles en réponse à des dommages à l'ADN qui serait intéressant à étudier concerne la possibilité que Stau2 pourrait elle-même être phosphorylée. En effet, des évidences de notre laboratoire montrent que Stau2 peut être phosphorylée dans certaines conditions (résultats de R. Beaujois, non présentés). Comme présenté dans la section 5.2 de l'introduction, la majorité des RBP qui sont régulées à la suite d'un stress cytotoxique doivent être phosphorylées pour accomplir leur fonction dans la réponse aux dommages. Bien sûr, les résultats présentés dans cette thèse indiquent principalement qu'une diminution de l'expression de Stau2 est observée en réponse à des

dommages à l'ADN, et ce dans des conditions de traitement qui causent des dommages assez importants pour éventuellement mener à la mort cellulaire. Cependant, il serait intéressant de vérifier si Stau2 ne doit pas d'abord être phosphorylée pour accomplir certaines fonctions à la suite d'un traitement avec une plus faible dose de drogue, ou un traitement plus court, pour par exemple promouvoir la réparation de l'ADN. Nous pourrions alors envisager que si les dommages deviennent trop considérables, la réparation de l'ADN ne serait plus un événement souhaitable dans la réponse, et que c'est ce qui justifierait la nécessité de diminuer l'expression de Stau2, afin de stimuler une réponse apoptotique. La prochaine section sera ainsi dédiée à discuter du rôle possible de Stau2, et particulièrement de la diminution de son expression, dans la réponse à un stress génotoxique, et l'accent sera mis sur le rôle de Stau2 dans la régulation posttranscriptionnelle de certaines cibles pertinentes à notre étude.

1.3 Rôle de Stau2 et de la diminution de son expression dans la réponse aux dommages à l'ADN?

Les protéines Staufen sont des protéines de liaison à l'ARN multifonctionnelles, ces fonctions ayant d'ailleurs été présentées dans la section 6.4 de l'introduction. Ainsi, les rôles de Stau2 incluent le transport de l'ARN (Goetze et al., 2006; Lebeau et al., 2011), sa dégradation via le *Staufen-mediated decay* (SMD) (Park et al., 2013), sa stabilisation (Heraud-Farlow et al., 2013), ainsi qu'un rôle possible dans l'épissage alternatif (O'Leary et al., 2009) et dans la régulation de la traduction (Miki et al., 2011). La fonction de Stau2 semble dépendre du type cellulaire et des conditions cellulaires, et possiblement aussi de la manière dont Stau2 s'associe avec ses ARNm, mais la question n'est pas encore tout à fait élucidée. De façon plus générale, il a été montré que Stau2 pourrait être impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire (Cockburn et al., 2012). Nous nous sommes alors questionnés sur la raison d'être de la diminution de l'expression de Stau2 en réponse aux dommages à l'ADN. Logiquement, nous pourrions croire que l'expression de Stau2 doive être diminuée afin de l'empêcher de jouer son rôle de régulateur posttranscriptionnel pendant certaines étapes de la réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, nous avons décidé de porter notre attention sur les ARNm liés par Stau2 et qui codent pour des protéines impliquées dans divers processus de la réponse aux dommages à l'ADN, avec un accent particulier sur l'apoptose. Nous nous

sommes donc basés sur les ARNm déjà identifiés comme des cibles se retrouvant en complexe avec Stau2 par notre laboratoire (Furic et al., 2008) pour sélectionner certains ARNm d'intérêts (Tableau I et Fig. 36). Cette section sera donc consacrée à discuter le choix de ces ARNm et comment la diminution de l'expression de Stau2 à la suite d'un stress génotoxique pourrait affecter la stabilité et/ou l'expression de ceux-ci. De plus, nous avons montré que la surexpression de Stau2 pendant la réponse aux dommages à l'ADN semble pouvoir retarder l'apparition de l'apoptose (Fig. 35), ce qui suggérerait un rôle antiapoptotique potentiel pour Stau2, mais sans exclure la possibilité que Stau2 pourrait jouer d'autres rôles dans la réponse au stress.

1.3.1 Association entre Stau2 et des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN

Le tableau I présente les ARNm que nous avons sélectionnés afin d'étudier plus en détail le rôle potentiel de Stau2 dans la réponse aux dommages à l'ADN, soient les ARNm codant pour la caspase 2, pour Bcl-xS et/ou Bcl-xL, DFFB, le cytochrome c, RAD1, PPP6C, MDM4 et E2F4. Nous avons choisi des ARNm codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose, soit des protéines proapoptotiques, comme la caspase 2, Bcl-xS et le cytochrome c, ou alors, dans le cas de Bcl-xL, antiapoptotique. En ce qui concerne DFFB, cette protéine constitue une des sous-unités formant le facteur impliqué dans la dégradation de l'ADN après le déclenchement de l'apoptose. Nous avons aussi sélectionné les ARNm codant pour RAD1, une protéine plutôt impliquée dans la réparation de l'ADN, ainsi que MDM4, un inhibiteur de p53, qui peut donc agir à plusieurs niveaux dans la réponse aux dommages à l'ADN. De plus, l'ARNm codant pour la phosphatase PPP6C a été examiné. Son rôle dans la réponse au stress n'est pas bien connu, mais des évidences montrent que la déplétion de son expression stimule l'apoptose (MacKeigan et al., 2005). Enfin, nous avons choisi l'ARNm codant pour E2F4, un facteur répresseur de la famille E2F dont l'expression semble être diminuée en réponse à un stress génotoxique (Ma et al., 2004). Ces ARNm ont été sélectionnés à partir des données de micropuces obtenues dans notre laboratoire afin d'identifier les ARNm présents dans un même complexe que Stau2-HA, dans des cellules HEK293T (Furic et al., 2008). Par conséquent, il est impératif de confirmer l'interaction entre Stau2 endogène et ces ARNm dans les cellules

HCT116 employées dans cette étude. Ce sera particulièrement intéressant de comparer si Stau2 s'associe aux ARNm codant pour Bcl-xS et Bcl-xL de la même façon. En fait, *bcl-xl* n'est plus long que *bcl-xs* que de 200 paires de bases, sur une longueur totale de plus de 2000 paires de bases, donc il serait pertinent de vérifier quelle région est reconnue par Stau2 dans cet/ces ARNm, une région commune aux deux transcrits ou la région supplémentaire présente dans *bcl-xl*, mais pas dans *bcl-xs*. Enfin, il faut préciser que plus de 8% des ARNm associés à Stau2 se retrouvent dans les catégories *apoptose* et *mort cellulaire* lorsqu'on se penche sur leur classification GO et que ce nombre augmente encore si on inclut d'autres processus de la réponse à l'ADN, comme la réparation de l'ADN (Furic et al., 2008). Conséquemment, les ARNm discutés ici ne sont pas les seuls pouvant s'associer à Stau2 et codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.

Jusqu'à maintenant, nous n'avons qu'effleuré la surface de tout le travail à faire par rapport à l'importance de l'interaction possible entre ces ARNm et Stau2, mais ce que nous avons souhaité faire d'abord et avant tout est d'étudier l'effet d'un traitement à la CPT sur l'expression de ces ARNm. La figure 36 montre ainsi que l'expression d'aucun des ARNm analysés n'est modifiée de façon aussi importante que celle de l'ARNm codant pour Stau2. Cependant, nous pouvons tout de même en tirer certaines observations supplémentaires, certaines attendues et certaines autres plus surprenantes. Ainsi, il n'est pas étonnant de remarquer une augmentation de l'expression des ARNm codant pour le cytochrome c, pour DFFB et pour RAD1, étant donné les fonctions importantes de ces protéines dans des processus spécifiques de la réponse aux dommages à l'ADN. Au contraire, nous observons une diminution de l'expression de *ppp6c*, ce qui concorde avec sa possible fonction antiapoptotique, et de *bcl-xl*. Néanmoins, nous observons aussi une diminution de l'expression de *bcl-xs*, ce qui semble de prime abord contradictoire. En effet, la régulation de l'épissage alternatif en faveur de *bcl-xs* en réponse à des dommages à l'ADN est assez bien documentée (section 5.2.1 de l'introduction), mais dans le présent cas, il ne semble pas y avoir de différence d'expression entre les deux messagers. Il est donc possible qu'une certaine régulation posttranscriptionnelle se produise en réponse à la CPT, mais que la régulation de l'interaction entre les différentes protéines de la famille Bcl-2 soit le type de régulation prédominante dans ce cas. Dans le cas de *mdm4* et d'*e2f4*, nous aurions pu nous attendre à

observer une diminution de leur expression, mais ce ne semble pas le cas. Cependant, à part une étude montrant une diminution de l'expression d'E2F4 en réponse à un stress génotoxique (Ma et al., 2004), la régulation posttranscriptionnelle de ces deux transcrits en réponse à des dommages à l'ADN ne semble pas avoir été étudiée, ce qui pourrait indiquer qu'ils ne sont tout simplement pas soumis à ce type de régulation. La même situation pourrait se produire en ce qui concerne l'expression de la caspase 2, dont la régulation principale doit résider dans le clivage de la procaspase 2 lors du déclenchement de l'apoptose.

La question du rôle de Stau2 par rapport à l'expression de ces ARNm se pose alors. La première expérience à effectuer serait de dépléter l'expression de Stau2 dans les cellules HCT116 à l'aide de petits ARN interférents, d'analyser les niveaux d'expression des ARNm d'intérêts et de comparer les résultats de cette expérience à ceux de la figure 36. De cette façon, nous pourrions vérifier si l'effet observé après un traitement à la CPT peut être reproduit en déplaçant directement l'expression de Stau2. Il est ainsi possible d'envisager un rôle pour Stau2 dans la stabilisation ou la déstabilisation de ses ARNm cibles. Par exemple, si l'expression des ARNm codant pour DFFB, RAD1 et le cytochrome c est toujours augmentée lors de la déplétion de l'expression de Stau2, ceci signifierait probablement que ces trois messagers sont des cibles du SMD. Leur expression dans des conditions normales serait donc diminuée via l'action négative de Stau2, et la réduction de Stau2 en réponse à des dommages à l'ADN serait nécessaire pour favoriser une augmentation de leur expression potentiellement essentielle à la mise en place de la réparation de l'ADN et/ou de l'apoptose. De la même façon, si une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour PPP6C est toujours observée à la suite de la déplétion de Stau2 à l'aide d'ARN interférents, nous pourrions imaginer alors que Stau2 stabiliserait l'ARNm *ppp6c* dans des conditions normales et que cette stabilisation serait inhibée lors de la réduction de l'expression de Stau2 en réponse à la CPT.

Idéalement, il serait intéressant d'effectuer une étude à plus grande échelle et de comparer une analyse de micropuces faite à partir de cellules HCT116 traitées à la CPT à une telle analyse réalisée à partir de cellules HCT116 dans lesquelles l'expression de Stau2 aurait préalablement été déplétée. De la sorte, nous pourrions avoir un aperçu plus exhaustif des ARNm dont l'expression est modulée en réponse à des dommages à l'ADN à cause de la

réduction de l'expression de Stau2. Ceci nous permettrait potentiellement d'identifier de façon plus générale les ARNm faisant partie d'un potentiel opéron d'ARNm codant pour des protéines jouant un rôle dans la réponse au stress génotoxique contrôlée par Stau2.

1.3.2 Stau2 a-t-elle un rôle antiapoptotique?

En plus de tenter de comprendre quel effet la diminution de Stau2 en réponse à la CPT peut avoir sur ses ARNm cibles, nous nous sommes demandé si cette diminution a une raison d'être qui se traduit par un effet plus général sur la survie ou la mort cellulaire. Pour se faire, nous avons surexprimé Stau2⁵⁹-FLAG₃ (S2F), dont l'expression n'est pas touchée par le stress génotoxique (Fig. 28), afin de vérifier si l'expression de Stau2 en même temps que la mise en place de la réponse aux dommages à l'ADN a un effet sur le déclenchement de l'apoptose. Comme le montre la figure 35, il semble que ce soit le cas. En effet, nous observons un taux moins élevé de clivage de PARP1 lorsque Stau2 est surexprimée, par rapport au contrôle. Ce résultat suggère par conséquent que la diminution de l'expression de Stau2 à la suite d'un stress génotoxique dans des cellules HCT116 serait importante pour réguler le déclenchement de l'apoptose. Il est important de noter que l'apoptose peut toujours se produire lorsque Stau2 est surexprimée, donc que la diminution de l'expression de Stau2 n'est pas essentielle à l'induction de l'apoptose, mais serait plutôt responsable d'un retard dans cette induction. Pour mesurer de façon plus précise ce retard, il sera éventuellement nécessaire de réaliser une expérience semblable à celle présentée à la figure 26, c'est-à-dire d'évaluer dans le temps l'effet de la CPT sur le déclenchement de l'apoptose avec ou sans surexpression de S2F. Nous nous attendons de cette façon à observer que l'apoptose se produit plus rapidement lorsque Stau2 n'est pas surexprimée.

Également, nous avons obtenu certains résultats préliminaires montrant que l'utilisation d'un shRNA pour dépléter l'expression de Stau2 juste avant de traiter les cellules avec la CPT favoriserait la mort cellulaire par rapport à la situation où l'expression de Stau2 est seulement diminuée de façon habituelle en réponse au stress (Fig. 39). Par conséquent, le résultat de la figure 35 et ces résultats préliminaires indiquent que Stau2 n'est probablement pas une protéine antiapoptotique à proprement dit, mais qu'il y aurait quand même une raison d'être physiologique à la réduction de son expression en réponse aux dommages à l'ADN. De

plus, si nous confirmons dans les cellules HCT116 le résultat selon lequel une déplétion encore plus importante de Stau2 lors du traitement avec la drogue peut accélérer la mise en place de l'apoptose, il sera intéressant d'évaluer si la situation se répète dans d'autres types de cellules cancéreuses. Évidemment, nous sommes encore loin de la mise en place d'un nouveau traitement contre le cancer, mais l'expression de Stau2 pourrait éventuellement représenter une cible spécifique à altérer pour stimuler une réponse apoptotique dans des cellules cancéreuses.

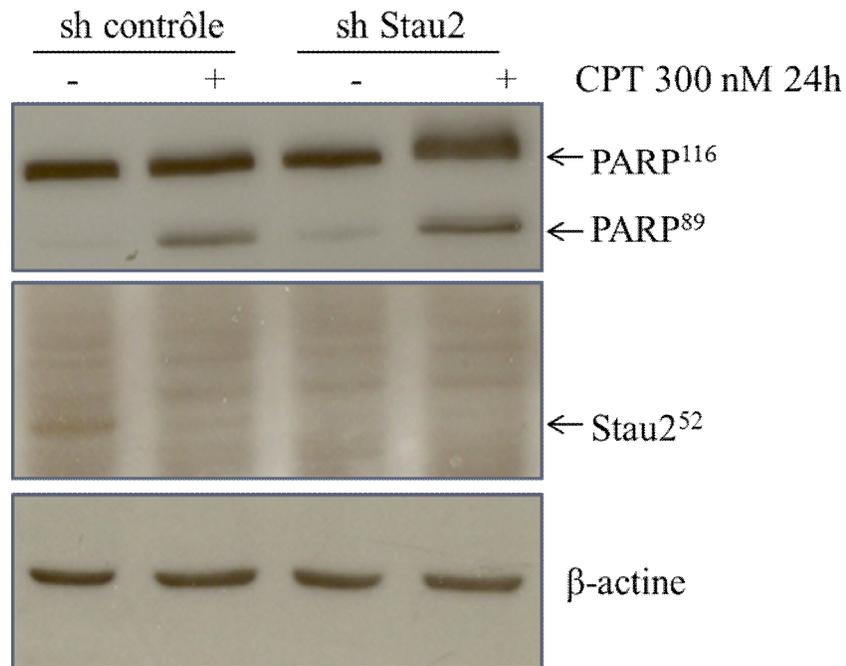


Figure 39. La déplétion de l'expression de Stau2 en même temps que le traitement à la CPT entraîne une petite augmentation de la quantité de PARP clivé.

1.3.3 Autres rôles possibles pour Stau2 dans la réponse aux dommages à l'ADN

Les résultats présentés dans le premier chapitre de la section Résultats ne nous permettent pas de rejeter un rôle pour Stau2 dans d'autres événements survenant pendant la réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, la diminution de l'expression de Stau2 se produit avant que l'apoptose ne soit enclenchée (Fig. 26) et aussi à des doses de CPT ne causant pas

de réponse apoptotique dans des cellules HCT116 (Fig. 24). De plus, comme discuté ci-dessus, l'expression de Stau2 est aussi diminuée dans d'autres types cellulaires dans lesquels la CPT n'induit pas de réponse apoptotique, comme des HEK293T (résultat de X. Zhang, non présenté). Ces résultats suggèrent donc que moduler l'expression de Stau2 pourrait affecter d'autres processus de la réponse aux dommages à l'ADN. Un des processus probablement touché est la régulation de la prolifération cellulaire. En effet, comme le montre une étude dans des embryons de poulet, la déplétion de Stau2 entraîne une diminution de la taille de l'œil, alors que l'expression ectopique de Stau2 cause une augmentation de celle-ci (Cockburn et al., 2012). Aussi, nous avons déjà observé que la déplétion de Stau2 avec des shRNA lors du traitement à la CPT engendre une diminution de la prolifération cellulaire des HCT116 (résultat de W. Viranaicken, non présenté). La CPT agissant principalement en inhibant la réplication de l'ADN, ceci implique un arrêt du cycle cellulaire en phase S. Par conséquent, il serait intéressant d'effectuer des analyses de cytométrie en flux après avoir surexprimé S2F dans des cellules et les avoir traitées à la CPT, pour vérifier si la surexpression de Stau2 empêche en partie l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, comme elle retarde l'induction de l'apoptose dans des cellules HCT116 (Fig. 35). De même, nous pourrions comparer la conséquence d'un même traitement dans des cellules HCT116 (présentant une réponse apoptotique à la CPT) et dans des cellules HEK293T (ne présentant pas de réponse apoptotique à la CPT). Ainsi, nous pourrions déterminer si la diminution de l'expression de Stau2 favorise plutôt l'apoptose dans un type cellulaire, les HCT116, alors qu'elle stimulerait de préférence l'arrêt de la prolifération cellulaire dans un autre, les HEK293T. L'arrêt de la prolifération cellulaire constitue aussi une conséquence d'un stress de courte durée ou de moindre intensité, donc il ne serait pas non plus surprenant d'observer ce phénomène dans les cellules HCT116 dans de telles conditions.

Nous ne pouvons pas non plus mettre de côté la possibilité de l'induction de la sénescence dans des types cellulaires où l'apoptose n'est pas induite par la CPT, ou encore lors de l'utilisation de faibles doses de la drogue ou d'un moindre temps de traitement. Le marqueur employé habituellement pour reconnaître des cellules sénescents est l'expression de la β -galactosidase. Pendant un traitement avec la CPT, nous pourrions éventuellement étudier l'effet de la surexpression de Stau2, ou de sa déplétion, sur la présence de β -

galactosidase dans les cellules, tout comme nous avons évalué le niveau de PARP1 clivé pour constater l'induction de l'apoptose dans les résultats présentés dans cette thèse. Puisque la CPT est capable d'induire la sénescence dans des cellules HCT116 lorsqu'une faible dose de 20 nM est utilisée (Han et al., 2002), nous pourrions employer de telles conditions pour vérifier si l'expression de Stau2 peut avoir un effet sur la sénescence induite dans ces cellules.

En somme, nous avons réussi à déterminer que l'expression de Stau2, mais pas de Stau1, est réduite de façon considérable en réponse à des stress génotoxiques et que cette diminution ne se produit pas seulement en conséquence de l'induction de l'apoptose dans les cellules traitées. De plus, nous avons montré que c'est principalement au niveau de la transcription du gène que l'expression de Stau2 est affectée par des dommages à l'ADN, et que ceci pourrait se produire en inhibant l'effet activateur d'E2F1 sur l'expression de Stau2. Enfin, nos résultats suggèrent un rôle physiologique pour la diminution de l'expression de Stau2 observée, étant donné que la présence de Stau2 pendant la mise en place de la réponse aux dommages à l'ADN retarde l'induction de l'apoptose. Les principales questions soulevées par notre étude et auxquelles il faudra tenter de répondre concernent surtout la régulation par Stau2 de ses ARNm cibles codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.

2. Stau1 et ses ARNm associés pendant la prométaphase

Cette section sera consacrée à l'analyse des résultats présentés dans la deuxième partie des Résultats et sur les perspectives qui leur sont associées. En plus d'avoir constaté une diminution de l'expression de Stau2 en réponse à des dommages à l'ADN, notre laboratoire a montré que l'expression de Stau1 peut aussi être modulée en fonction des conditions. Ainsi, comme présenté dans la section 2.1 des Résultats, nous avons découvert que l'expression de Stau1 augmente entre la fin de la phase S et la prométaphase, et que la protéine est dégradée pendant que la cellule complète la mitose. Aussi, la surexpression de Stau1 entraîne un défaut dans l'entrée de la cellule en mitose et affecte la prolifération de cellules cancéreuses. Pour tenter d'expliquer pourquoi une telle variation de l'expression de Stau1 se produit à ce moment du cycle cellulaire, nous avons fait l'hypothèse qu'elle se produisait afin de réguler

les fonctions de Stau1 en tant que régulateur posttranscriptionnel et qu'elle pourrait affecter le métabolisme des ARNm associés à Stau1 pendant la mitose. Nous avons donc effectué une analyse RIP-CHIP afin d'identifier les ARNm associés à Stau1 dans des cellules HEK293T bloquées en prométaphase avec du nocodazole (Fig. 37). De cette façon, 275 ARNm ont été retrouvés enrichis dans un même complexe avec Stau1 au moment de la prométaphase (Tableau III). Nous avons par la suite validé l'interaction entre Stau1 et certains ARNm codant pour des protéines impliquées dans la progression de la mitose et/ou la prolifération cellulaire (Fig. 38). Cette expérience nous a aussi permis de constater une association plus grande entre ces ARNm et Stau1 dans les cellules bloquées en prométaphase, par rapport aux cellules asynchrones, ce qui suggère que Stau1 pourrait effectivement réguler leur expression et/ou leur localisation à cette étape cruciale du cycle cellulaire.

2.1 Interaction entre Stau1 et des ARNm codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire

Afin d'identifier les ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase, nous avons transfecté des cellules HEK293T avec un vecteur codant pour Stau1⁵⁵-FLAG, et après avoir synchronisées ces cellules avec du nocodazole, nous avons fait une immunoprécipitation avec un anticorps reconnaissant l'épitope FLAG et isolé les ARNm coprécipités afin d'effectuer une hybridation de micropuces. Une immunoprécipitation FLAG a été choisie en raison de la grande spécificité de l'anticorps pour l'épitope FLAG et de la possibilité de faire l'élution à la fin de l'IP avec le peptide FLAG. Ainsi, nous avons voulu favoriser la spécificité de l'expérience, afin d'identifier réellement les ARNm en complexe avec Stau1 et éviter le plus possible les faux positifs. De plus, la protéine Stau1⁵⁵-FLAG a été exprimée à un niveau encore plus faible que celui de la protéine endogène (Fig. 37A), toujours dans le but d'obtenir les résultats les plus spécifiques envisageables. À la suite d'une analyse plutôt rigoureuse des résultats des micropuces, nous avons obtenu une liste de 275 ARNm associés à Stau1 et enrichis au moins 2,5 fois dans l'IP Stau1⁵⁵-FLAG par rapport à l'IP contrôle (Tableau III). Il faut noter que nous ne pouvons pas savoir si les ARNm identifiés sont associés directement avec Stau1, mais seulement qu'ils se retrouvent dans un même complexe. Une première étude vient en fait tout juste d'être réalisée pour identifier des ARNm liés à Stau1 après avoir créé

une réticulation entre les deux à l'aide du formaldéhyde (Ricci et al., 2014). La méthode de réticulation habituelle, à l'aide de rayons UV, n'est pas efficace pour la réticulation avec Stau1 étant donné que la protéine reconnaît surtout le squelette sucre-phosphate de l'ARN (Ramos et al., 2000; Ricci et al., 2014). Nous reviendrons un peu plus loin sur la comparaison des données de cette étude avec les ARNm identifiés ici.

Une première constatation à faire lors de la comparaison entre la classification GO des ARNm liés par Stau1 dans des cellules asynchrones (Furic et al., 2008) et celle des ARNm liés par Stau1 pendant la prométaphase (Fig. 37C) est qu'elle est assez similaire, particulièrement en ce qui concerne les ARNm codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme et dans la transcription. Néanmoins, 8% des ARNm identifiés dans cette étude codent pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, ce qui représente un pourcentage important. Afin de valider les résultats obtenus grâce aux micropuces, nous avons sélectionné certains ARNm parmi ceux associés à Stau1 en se basant principalement sur le fait qu'ils encodent des protéines jouant un rôle dans la progression de la mitose ou dans la prolifération cellulaire. Les ARNm codant pour les protéines suivantes ont été sélectionnés : APAF1, RB1, SPC24, AJUBA (JUB), MOBKL2B (MOB) et VHL. Les fonctions de ces protéines sont décrites à la section 2.3 des Résultats, mais pour résumer, RB1 et VHL sont surtout impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, APAF1 est un facteur impliqué dans l'apoptose, alors que SPC24, JUB et MOB semblent jouer un rôle important dans la mise en place de la mitose et dans sa progression. Dans ce cas, nous avons voulu vérifier leur association avec la protéine endogène, et c'est pourquoi nous avons employé un anticorps reconnaissant Stau1 pour réaliser l'immunoprécipitation (Fig. 38A).

En premier lieu, nous avons vérifié l'interaction entre Stau1 endogène et chaque ARNm d'intérêt dans des cellules HEK293T bloquées en prométaphase (Fig. 38B). Nous avons donc comparé l'enrichissement de chaque ARNm dans l'IP Stau1 par rapport à l'IP contrôle, puis normalisé le résultat obtenu par le même ratio pour l'ARNm codant pour RPL22, un ARNm abondant codant pour une protéine ribosomique. Cet ARNm a été employé comme contrôle de normalisation avant tout puisqu'il ne se retrouve pas en complexe avec Stau1 selon les résultats des analyses de micropuces. La figure 38B indique que cinq des six

ARNm sélectionnés sont, en effet, associés à Stau1 au moment de la prométaphase, la seule exception étant *apaf1*. C'est ici que devient intéressante la comparaison des résultats obtenus dans notre étude avec ceux de l'étude de Ricci mentionnée ci-dessus, surtout que leur étude a été effectuée dans le même type cellulaire. En effet, leurs résultats indiquent que les ARNm codant pour APAF1, SPC24, JUB et VHL peuvent tous être liés par Stau1 dans leur 3'UTR, alors qu'ils n'ont pas trouvé d'association avec les ARNm codant pour Rb1 et MOB (Ricci et al., 2014). Bien sûr, leur étude a été faite dans des cellules asynchrones, mais nous avons nous-mêmes comparé l'enrichissement de nos ARNm d'intérêt avec Stau1 dans des cellules asynchrones par rapport aux cellules bloquées en prométaphase (Fig. 38C). Il est intéressant de noter que les six ARNm sont plus abondants dans les complexes avec Stau1 lorsque les cellules sont traitées au nocodazole que lorsqu'elles sont laissées asynchrones, bien que la différence soit significative seulement pour quatre d'entre eux. Cette augmentation de l'association entre Stau1 et ses ARNm cibles semble spécifique puisqu'une quantité comparable de Stau1 a été immunoprécipitée dans les deux conditions (Fig. 38A) et que les ARNm sont présents à des quantités comparables dans les cellules asynchrones et dans les cellules synchronisées (Fig. 38D). Il y a seulement l'expression de JUB qui est un peu plus élevée dans les cellules en prométaphase par rapport à son expression dans les cellules asynchrones (Fig. 38D).

Tous ces résultats nous indiquent alors que l'interaction entre Stau1 et *spc24*, *jub* et *vhl* est possible dans des conditions asynchrones et favorisée dans des cellules en prométaphase, et que cette interaction semble directe (Ricci et al., 2014). En ce qui concerne *rb1* et *mob*, il semble y avoir association entre Stau1 et ces ARNm, mais il est possible que cette interaction soit indirecte, ou qu'elle se produise de façon préférentielle seulement au moment de la prométaphase. Enfin, les résultats à propos d'*apaf1* sont plus ambigus, puisque d'autres évidences montrent que Stau1 se lie à son 3'UTR directement (Ricci et al., 2014) et que son association semble augmenter avec Stau1 dans des cellules traitées au nocodazole, bien que la figure 38B indique qu'il n'est pas vraiment enrichi dans un complexe avec Stau1. Les résultats des figures 38B, C et D ont tous été normalisés par l'enrichissement obtenu pour l'ARNm contrôle RPL22, alors tous les ARNm ne sont clairement pas aussi enrichis avec Stau1 dans les cellules synchronisées par rapport aux cellules asynchrones. Nonobstant, il faudrait

idéalement comparer d'autres cibles de Stau1 avec d'autres ARNm non liés pour s'assurer que l'augmentation de l'association observée en prométaphase se produit seulement pour des ARNm qui sont réellement liés par Stau1 et n'est pas seulement une conséquence imprévue de l'expérimentation.

Étant donné que l'expression de Stau1 varie dans plusieurs phases du cycle cellulaire, c'est-à-dire qu'elle commence à augmenter à la fin de la phase S et qu'elle diminue après la prométaphase, pendant la complétion de la mitose et jusqu'à la phase G1, il serait intrigant de faire d'autres analyses de micropuces à partir de cellules synchronisées dans diverses autres phases du cycle cellulaire pour comparer l'association entre Stau1 et ses ARNm cibles à travers le cycle cellulaire. Comme les résultats présentés ici pointent vers une plus grande association de certains ARNm avec Stau1 pendant la prométaphase, nous pourrions nous attendre à ce que la variation d'expression de Stau1 pendant le restant du cycle ait un effet similaire sur les ARNm avec lesquels elle se retrouve en complexe. Est-ce que ce sont les mêmes ARNm qui sont liés à travers toutes les phases du cycle cellulaire ou est-ce que Stau1 peut s'associer à des ARNm différents en fonction de la phase et de son niveau d'expression? De façon aussi importante, il faudrait déterminer comment la variation d'expression de Stau1 affecte son rôle dans la régulation posttranscriptionnelle de l'expression et comment les ARNm en sont touchés. De même, nous pourrions préciser le rôle de Stau1 pendant la prométaphase.

2.2 Rôle de Stau1 pendant la prométaphase?

Tout comme Stau2, Stau1 est impliquée dans plusieurs processus de la régulation posttranscriptionnelle de l'expression, transport de l'ARN (Kanai et al., 2004; Vessey et al., 2008), régulation de la traduction (Dugre-Brisson et al., 2005; Elbarbary et al., 2013; Ricci et al., 2014), dégradation de l'ARN via le SMD (Kim et al., 2005; Park and Maquat, 2013), export nucléaire et épissage alternatif (Ravel-Chapuis et al., 2012). Pour le moment, nous ne savons pas laquelle ou lesquelles de ces fonctions de Stau1 pourraient être importantes au moment de la prométaphase, mais nous pouvons poser quelques hypothèses. Tout d'abord, il serait surprenant que le SMD soit actif pendant la mitose étant donné que l'interaction entre

Stau1 et Upfl, essentielle pour que la dégradation de l'ARN se produise, est défavorisée pendant cette phase du cycle cellulaire (résultat de K. Boulay, non présenté). Deux autres mécanismes pourraient néanmoins se produire, le transport d'ARNm sur le fuseau mitotique et la régulation de leur traduction.

Une possibilité à étudier concernant le rôle de Stau1 pendant la mitose est en effet le transport d'ARNm sur le fuseau mitotique. La localisation d'ARN sur les microtubules du fuseau (mitotique ou méiotique) a déjà été observée chez la drosophile, le xénope et dans les cellules humaines, à des fins de ségrégation dans les cellules-filles ou de traduction locale directement sur le fuseau (Blower et al., 2007; Eliscovich et al., 2008; Groisman et al., 2000; Raff et al., 1990). Ces études montrent d'ailleurs que la localisation et la traduction des ARNm au fuseau mitotique sont importantes pour la progression de la mitose. Comme mentionné dans la section 6.2 de l'introduction, les protéines Staufen possèdent un domaine de liaison à la tubuline, colocalisent avec les microtubules, et le transport de particules contenant Stau dans les neurones se fait généralement le long de microtubules (Kanai et al., 2004; Kiebler et al., 1999; Wickham et al., 1999). Par conséquent, il semble que Stau1 serait une protéine de liaison à l'ARN idéale pour localiser des ARNm sur le fuseau mitotique. De plus, les ARNm présents sur le fuseau mitotique dans des cellules HeLa ont été analysés et parmi ceux-ci, 71 ont aussi été identifiés comme des ARNm associés à Stau1 pendant la prométaphase (Blower et al., 2007). Aucun des ARNm étudiés à la figure 38 ne fait partie de cette liste, mais en considérant les rôles et l'association des protéines SPC24 et JUB aux microtubules, il serait tout de même intéressant d'examiner la localisation des ARNm codant pour celles-ci pendant la prométaphase. En fait, nous ne connaissons pas encore non plus la localisation de Stau1 à cette étape du cycle, alors il faudrait d'abord la vérifier à l'aide de la technique de l'immunofluorescence. De même, la localisation des ARNm pourrait être évaluée via hybridation *in situ* utilisant la fluorescence (FISH). Par la suite, il serait utile de dépléter l'expression de Stau1 à l'aide d'un ARNm interférent pour comparer la localisation des ARNm en présence de Stau1 et lors de sa déplétion.

À la suite de la localisation sur le fuseau mitotique, Stau1 pourrait être impliquée dans l'induction de la traduction des transcrits localisés. De même, il est possible que Stau1 puisse

réguler la traduction de ses ARNm cibles peu importe s'ils sont localisés aux microtubules du fuseau ou non. Ainsi, l'augmentation de l'expression de Stau1 observée dès la fin de la phase S pourrait contribuer à faciliter l'expression de protéines essentielles dans la mise en place de la mitose. Par exemple, SPC24 est nécessaire pour faire le lien entre les centromères des chromosomes et les microtubules via son association avec le kinétochore, pour gérer l'alignement des chromosomes pendant la métaphase et pour assurer le mouvement des chromosomes vers les pôles lors de l'anaphase (McClelland et al., 2004). La protéine Ajuba, quant à elle, est un activateur de la kinase Aurora A pendant la phase G2 et cette activation est essentielle pour permettre l'entrée dans la mitose (Hirota et al., 2003), alors que VHL est importante pour garantir la bonne orientation du fuseau mitotique (Thoma et al., 2009). En plus des ARNm que nous avons analysés à la figure 38, la liste des autres ARNm identifiés à l'aide des micropuces (Tableau III) indique d'autres gènes qui sont importants dans divers aspects de la mitose, comme le gène codant pour CHFR, une ubiquitine-ligase impliquée dans le point de contrôle régulant l'entrée de la cellule dans la mitose (Kang et al., 2002). Une des façons par lesquelles Stau1 est capable de réguler la traduction de ses ARNm cibles est en s'associant avec des séquences Alu inversées répétées présentes dans leur 3'UTR (Elbarbary et al., 2013). Il est donc significatif que 33% des ARNm liés pas Stau1 en prométaphase possèdent des séquences Alu inversées répétées. Parmi ceux-ci, *vhl* peut être lié directement par Stau1 via une séquence Alu inversée répétée dans son 3'UTR (Ricci et al., 2014). Il serait donc intéressant de vérifier si Stau1 peut stimuler la traduction de VHL tout juste avant la mitose, afin que la protéine puisse exercer son rôle dans l'orientation du fuseau mitotique. Si effectivement Stau1 est capable de faciliter l'expression de protéines impliquées dans la mitose, il est logique de penser que sa dégradation par l'APC/C est nécessaire afin d'inhiber leur expression alors que la cellule complète la mitose et termine sa division cellulaire.

Conclusion

La non-spécificité et la toxicité des drogues chimiothérapeutiques demeurent encore aujourd'hui des problèmes significatifs dans le traitement du cancer. Il est donc essentiel de tenter de comprendre précisément comment les cellules cancéreuses réagissent face au traitement afin d'optimiser le type de réponse souhaitée face à ce traitement. La réponse aux dommages à l'ADN causés par la chimiothérapie est complexe et mène la cellule vers plusieurs destins possibles, certains favorables pour la réussite du traitement, et certains autres, défavorables. La régulation posttranscriptionnelle de l'expression des gènes est de plus en plus reconnue comme ayant un rôle prépondérant dans la décision du destin d'une cellule en réponse à un stress génotoxique. Des processus cellulaires majeurs peuvent ainsi être affectés par des changements dans les mécanismes de contrôle posttranscriptionnel de l'expression, plus particulièrement dans l'expression des RBP qui sont impliquées dans ces mécanismes. Nous présentons ici le cas des protéines Staufen, dont l'expression varie en fonction des conditions cellulaires.

Les résultats présentés dans cette thèse montrent ainsi pour la première fois que l'expression de la protéine de liaison à l'ARN Staufen2 est affectée au niveau de sa transcription par des traitements cytotoxiques. Aussi, lorsque Stau2 est surexprimée dans des conditions de traitement dans lesquelles elle est normalement déplétée, ceci entraîne un retard dans l'induction de l'apoptose engendrée par le stress génotoxique. Il reste maintenant à préciser de quelle façon Stau2, ou à tout le moins la diminution de son expression, affecte la réponse de la cellule face au traitement. Nous envisageons ainsi que le contrôle posttranscriptionnel assuré par Stau2 soit modulé en réponse à des dommages à l'ADN et que ceci confère à la protéine un rôle possiblement important dans cette réponse.

De la même façon, l'expression de Stau1 varie pendant le cycle cellulaire et nous avons fait le pari que cette variation joue un rôle important pour modifier la régulation posttranscriptionnelle de certains ARNm associés à Stau1. C'est pourquoi nous avons voulu découvrir quels ARNm se trouvent en complexe avec Stau1 pendant la prométaphase, alors que son expression est la plus élevée dans le cycle cellulaire. Il sera maintenant intéressant

d'évaluer exactement de quelle façon la variation dans l'expression de Stau1 affecte l'expression et/ou la localisation de ses ARNm cibles et quel rôle elle joue dans la régulation plus générale de la prolifération cellulaire et de la progression du cycle cellulaire.

Bibliographie

- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J.D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D.A., *et al.* (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol. Cell* *25*, 543-557.
- Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U., and Kelekar, A. (2007). Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* *14*, 500-510.
- Abrahamyan, L.G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M.P., Monette, A., Clement, J.F., Song, R., Lehmann, M., DesGroseillers, L., Laughrea, M., *et al.* (2010). Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J. Cell Sci.* *123*, 369-383.
- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nature cell biology* *14*, 318-328.
- Bachand, F., Triki, I., and Autexier, C. (2001). Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* *29*, 3385-3393.
- Badura, M., Braunstein, S., Zavadil, J., and Schneider, R.J. (2012). DNA damage and eIF4G1 in breast cancer cells reprogram translation for survival and DNA repair mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 18767-18772.
- Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhauser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., *et al.* (2012). The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol. Cell* *46*, 674-690.
- Baranello, L., Bertozzi, D., Fogli, M.V., Pommier, Y., and Capranico, G. (2010). DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1alpha gene locus. *Nucleic Acids Res* *38*, 159-171.
- Barbier, J., Dutertre, M., Bittencourt, D., Sanchez, G., Gratadou, L., de la Grange, P., and Auboeuf, D. (2007). Regulation of H-ras splice variant expression by cross talk between the p53 and nonsense-mediated mRNA decay pathways. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7315-7333.
- Baritaki, S., Huerta-Yepez, S., Sakai, T., Spandidos, D.A., and Bonavida, B. (2007). Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-

- regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1. *Molecular cancer therapeutics* 6, 1387-1399.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26, 7773-7779.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-870.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
- Belanger, G., Stocksley, M.A., Vandromme, M., Schaeffer, L., Furic, L., DesGroseillers, L., and Jasmin, B.J. (2003). Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *J. Neurochem.* 86, 669-677.
- Bell, L.A., O'Prey, J., and Ryan, K.M. (2006). DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene* 25, 5656-5663.
- Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* 22, 161-167.
- Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Res.* 72, 13-17.
- Blattner, C., Sparks, A., and Lane, D. (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3704-3713.
- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 149-160.
- Blower, M.D., Feric, E., Weis, K., and Heald, R. (2007). Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J. Cell Biol.* 179, 1365-1373.
- Boucas, J., Riabinska, A., Jokic, M., Herter-Sprie, G.S., Chen, S., Hopker, K., and Reinhardt, H.C. (2012). Posttranscriptional regulation of gene expression-adding another layer of complexity to the DNA damage response. *Frontiers in genetics* 3, 159.
- Boulay, K., Ghram, M., Viranaicken, W., Trepanier, V., Mollet, S., Frechina, C., and DesGroseillers, L. (2014). Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res.*

- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* *19*, 2122-2137.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature reviews. Cancer* *7*, 495-507.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* *384*, 239-246.
- Brizard, F., Luo, M., and Desgroseillers, L. (2000). Genomic organization of the human and mouse stau genes. *DNA Cell Biol.* *19*, 331-339.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., and Doe, C.Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* *391*, 792-795.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* *434*, 913-917.
- Buchner, G., Bassi, M.T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. (1999). Identification of a novel homolog of the Drosophila staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* *62*, 113-118.
- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* *104*, 263-269.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* *8*, 729-740.
- Cao, A.R., Rabinovich, R., Xu, M., Xu, X., Jin, V.X., and Farnham, P.J. (2011). Genome-wide analysis of transcription factor E2F1 mutant proteins reveals that N- and C-terminal protein interaction domains do not participate in targeting E2F1 to the human genome. *J. Biol. Chem.* *286*, 11985-11996.
- Carnevale, J., Palander, O., Seifried, L.A., and Dick, F.A. (2012). DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 900-912.
- Castaneda, F., Rosin-Steiner, S., and Jung, K. (2007). Functional genomics analysis of low concentration of ethanol in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. Role of genes involved in transcriptional and translational processes. *International journal of medical sciences* *4*, 28-35.

- Castellano, G., Torrisi, E., Ligresti, G., Malaponte, G., Militello, L., Russo, A.E., McCubrey, J.A., Canevari, S., and Libra, M. (2009). The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression. *Cell cycle* 8, 1367-1372.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., *et al.* (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 149, 1393-1406.
- Chabner, B.A., and Roberts, T.G., Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature reviews. Cancer* 5, 65-72.
- Chandler, D.S., Singh, R.K., Caldwell, L.C., Bitler, J.L., and Lozano, G. (2006). Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer Res.* 66, 9502-9508.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 21, 3704-3714.
- Chang, E.T., Donahue, J.M., Xiao, L., Cui, Y., Rao, J.N., Turner, D.J., Twaddell, W.S., Wang, J.Y., and Battafarano, R.J. (2012). The RNA-binding protein CUG-BP1 increases survivin expression in oesophageal cancer cells through enhanced mRNA stability. *Biochem. J.* 446, 113-123.
- Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., *et al.* (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell* 26, 745-752.
- Chen, D., Padiernos, E., Ding, F., Lossos, I.S., and Lopez, C.D. (2005). Apoptosis-stimulating protein of p53-2 (ASPP2/53BP2L) is an E2F target gene. *Cell Death Differ.* 12, 358-368.
- Chen, J., Guo, K., and Kastan, M.B. (2012). Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J. Biol. Chem.* 287, 16467-16476.
- Chen, J., and Kastan, M.B. (2010). 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev.* 24, 2146-2156.
- Chen, J., Zhu, F., Weaks, R.L., Biswas, A.K., Guo, R., Li, Y., and Johnson, D.G. (2011). E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell cycle* 10, 1287-1294.

- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* *81*, 505-512.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* *37*, 299-310.
- Cho, H., Kim, K.M., Han, S., Choe, J., Park, S.G., Choi, S.S., and Kim, Y.K. (2012a). Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Mol. Cell* *46*, 495-506.
- Cho, S.J., Jung, Y.S., Zhang, J., and Chen, X. (2012b). The RNA-binding protein RNPC1 stabilizes the mRNA encoding the RNA-binding protein HuR and cooperates with HuR to suppress cell proliferation. *J. Biol. Chem.* *287*, 14535-14544.
- Cho, S.J., Zhang, J., and Chen, X. (2010). RNPC1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability. *Nucleic Acids Res* *38*, 2256-2267.
- Chong, J.L., Wenzel, P.L., Saenz-Robles, M.T., Nair, V., Ferrey, A., Hagan, J.P., Gomez, Y.M., Sharma, N., Chen, H.Z., Ouseph, M., *et al.* (2009). E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature* *462*, 930-934.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiacovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18475-18480.
- Chowdhury, D., Choi, Y.E., and Brault, M.E. (2013). Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* *14*, 181-189.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* *40*, 179-204.
- Cockburn, D.M., Charish, J., Tassew, N.G., Eubanks, J., Bremner, R., Macchi, P., and Monnier, P.P. (2012). The double-stranded RNA-binding protein Staufen 2 regulates eye size. *Mol. Cell. Neurosci.* *51*, 101-111.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature reviews. Cancer* *10*, 51-57.
- Collins, I., Weber, A., and Levens, D. (2001). Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8437-8451.

- Consortium, E.P. (2011). A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS biology* 9, e1001046.
- Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* 6, 2853-2868.
- Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., and Nikitin, A.Y. (2007). MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* 67, 8433-8438.
- Cowling, V., and Downward, J. (2002). Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* 9, 1046-1056.
- Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21, 1359-1369.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., *et al.* (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nature cell biology* 4, 11-19.
- de Bruin, E.C., and Medema, J.P. (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat. Rev.* 34, 737-749.
- Decorsiere, A., Cayrel, A., Vagner, S., and Millevoi, S. (2011). Essential role for the interaction between hnRNP H/F and a G quadruplex in maintaining p53 pre-mRNA 3'-end processing and function during DNA damage. *Genes Dev.* 25, 220-225.
- DesGroseillers, L., and Lemieux, N. (1996). Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36, 527-529.
- Di Como, C.J., Gaiddon, C., and Prives, C. (1999). p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1438-1449.
- Dias, C.S., Liu, Y., Yau, A., Westrick, L., and Evans, S.C. (2006). Regulation of hdm2 by stress-induced hdm2alt1 in tumor and nontumorigenic cell lines correlating with p53 stability. *Cancer Res.* 66, 9467-9473.
- Dick, F.A., and Dyson, N. (2003). pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol. Cell* 12, 639-649.

- Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews. Molecular cell biology* *14*, 297-306.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9363-9367.
- Duchaine, T., Wang, H.J., Luo, M., Steinberg, S.V., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (2000). A novel murine Staufin isoform modulates the RNA content of Staufin complexes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5592-5601.
- Duchaine, T.F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M.A., and DesGroseillers, L. (2002). Staufin2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J. Cell Sci.* *115*, 3285-3295.
- Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. (2005). Interaction of Staufin1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* *33*, 4797-4812.
- Durie, D., Lewis, S.M., Liwak, U., Kisilewicz, M., Gorospe, M., and Holcik, M. (2011). RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation. *Oncogene* *30*, 1460-1469.
- Dutertre, M., Sanchez, G., De Cian, M.C., Barbier, J., Dardenne, E., Gratadou, L., Dujardin, G., Le Jossic-Corcus, C., Corcos, L., and Auboeuf, D. (2010). Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nature structural & molecular biology* *17*, 1358-1366.
- Edmond, V., Moysan, E., Khochbin, S., Matthias, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2011). Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J.* *30*, 510-523.
- Elbarbary, R.A., Li, W., Tian, B., and Maquat, L.E. (2013). STAU1 binding 3' UTR IRAlus complements nuclear retention to protect cells from PKR-mediated translational shutdown. *Genes Dev.* *27*, 1495-1510.
- Eliscovich, C., Peset, I., Vernos, I., and Mendez, R. (2008). Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nature cell biology* *10*, 858-865.
- Engelmann, D., and Putzer, B.M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* *13*, 119-131.
- Engelmann, D., and Putzer, B.M. (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Res.* *72*, 571-575.

- Erickson, S.L., and Lykke-Andersen, J. (2011). Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J. Cell Sci.* *124*, 293-297.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., and Gonzalez Baron, M. (2003). Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat. Rev.* *29*, 515-523.
- Espinosa, J.M. (2008). Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene* *27*, 4013-4023.
- Fa-Hui, N., Hai-Feng, Y., Rui-Feng, Q., Xin, L., and Cai-Bin, W. (2008). Characterization of a novel transcript variant of human STAU1 gene. *Acta Biochim. Pol.* *55*, 473-478.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* *434*, 605-611.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat. Genet.* *30*, 290-294.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* *434*, 917-921.
- Feng, L., Hollstein, M., and Xu, Y. (2006). Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence. *Cell cycle* *5*, 2812-2819.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* *14*, 2015-2027.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Stauf protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* *79*, 1221-1232.
- Fogal, V., Hsieh, J.K., Royer, C., Zhong, S., and Lu, X. (2005a). Cell cycle-dependent nuclear retention of p53 by E2F1 requires phosphorylation of p53 at Ser315. *EMBO J.* *24*, 2768-2782.
- Fogal, V., Kartasheva, N.N., Trigiant, G., Llanos, S., Yap, D., Vousden, K.H., and Lu, X. (2005b). ASPP1 and ASPP2 are new transcriptional targets of E2F. *Cell Death Differ.* *12*, 369-376.
- Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J., and Rastinejad, F. (1999). Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* *286*, 2507-2510.

- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92-105.
- Furic, L., Maher-Laporte, M., and DesGroseillers, L. (2008). A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* *14*, 324-335.
- Gewirtz, D.A., Holt, S.E., and Elmore, L.W. (2008). Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 947-957.
- Gleghorn, M.L., Gong, C., Kielkopf, C.L., and Maquat, L.E. (2013). Staufen1 dimerizes through a conserved motif and a degenerate dsRNA-binding domain to promote mRNA decay. *Nature structural & molecular biology* *20*, 515-524.
- Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* *582*, 1977-1986.
- Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M.M., Thomas, S., Pehl, U., Boehm, S., Macchi, P., and Kiebler, M.A. (2006). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* *172*, 221-231.
- Gong, C., Kim, Y.K., Woeller, C.F., Tang, Y., and Maquat, L.E. (2009). SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev.* *23*, 54-66.
- Gong, C., and Maquat, L.E. (2011). lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* *470*, 284-288.
- Gordon, R.R., and Nelson, P.S. (2012). Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* *15*, 123-131.
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., and Bonavida, B. (2006). Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* *25*, 1125-1142.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Dittullo, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., *et al.* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907-913.
- Groisman, I., Huang, Y.S., Mendez, R., Cao, Q., Theurkauf, W., and Richter, J.D. (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* *103*, 435-447.

- Gu, B., and Zhu, W.G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *International journal of biological sciences* 8, 672-684.
- Guo, N., and Peng, Z. (2013). MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 9, 6-11.
- Guo, R., Chen, J., Zhu, F., Biswas, A.K., Berton, T.R., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2010). E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 285, 19308-19315.
- Han, S., Park, K., Bae, B.N., Kim, K.H., Kim, H.J., Kim, Y.D., and Kim, H.Y. (2003). E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res. Treat.* 82, 11-16.
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J.W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E.A., Balan, K.V., Pantazis, P., and Wyche, J.H. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J. Biol. Chem.* 277, 17154-17160.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R.A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 8, 193-204.
- Heraud-Farlow, J.E., Sharangdhar, T., Li, X., Pfeifer, P., Tauber, S., Orozco, D., Hormann, A., Thomas, S., Bakosova, A., Farlow, A.R., *et al.* (2013). Stauf2 Regulates Neuronal Target RNAs. *Cell reports* 5, 1511-1518.
- Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., and Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ.* 12, 377-383.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.
- Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475-1485.

- Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M.L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nature cell biology* 4, 1-10.
- Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M., and Karlstrom, O. (1998). E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* 17, 143-155.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260, 14873-14878.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., and Liu, L.F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 49, 5077-5082.
- Hsieh, J.K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K., and Lu, X. (1997). E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev.* 11, 1840-1852.
- Hsieh, J.K., Yap, D., O'Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., and Lu, X. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 22, 78-93.
- Huang, X., Kurose, A., Tanaka, T., Traganos, F., Dai, W., and Darzynkiewicz, Z. (2006). Activation of ATM and histone H2AX phosphorylation induced by mitoxantrone but not by topotecan is prevented by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. *Cancer biology & therapy* 5, 959-964.
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A.M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., *et al.* (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 142, 409-419.
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 279, 30830-30835.
- Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., and Lees, J.A. (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer cell* 15, 184-194.
- Iaquinata, P.J., and Lees, J.A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 649-657.
- Ingram, L., Munro, S., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2011). E2F-1 regulation by an unusual DNA damage-responsive DP partner subunit. *Cell Death Differ.* 18, 122-132.

- Inoue, Y., Kitagawa, M., and Taya, Y. (2007). Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.* 26, 2083-2093.
- Iorio, M.V., and Croce, C.M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 33, 1126-1133.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., *et al.* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407, 645-648.
- Ishimaru, D., Ramalingam, S., Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., Dellis, S., Tholanikunnel, B.G., Fernandes, D.J., and Spicer, E.K. (2009). Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Molecular cancer research : MCR* 7, 1354-1366.
- Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G., Masucci, M., Pramanik, A., and Selivanova, G. (2004). Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat. Med.* 10, 1321-1328.
- Jackson, S.P. (2009). The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 483-494.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.
- Jeong, J.H., Nam, Y.J., Kim, S.Y., Kim, E.G., Jeong, J., and Kim, H.K. (2007). The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurochem.* 102, 2073-2084.
- Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev.* 17, 3062-3074.
- Jin, Z., and El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy* 4, 139-163.
- Kanai, M., Hanashiro, K., Kim, S.H., Hanai, S., Boulares, A.H., Miwa, M., and Fukasawa, K. (2007). Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation). *Nature cell biology* 9, 1175-1183.

- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525.
- Kang, D., Chen, J., Wong, J., and Fang, G. (2002). The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J. Cell Biol.* 156, 249-259.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 15, 1126-1132.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Kawai, S., and Amano, A. (2012). BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J. Cell Biol.* 197, 201-208.
- Keene, J.D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature reviews. Genetics* 8, 533-543.
- Keene, J.D., Komisarow, J.M., and Friedersdorf, M.B. (2006). RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nature protocols* 1, 302-307.
- Keene, J.D., and Tenenbaum, S.A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell* 9, 1161-1167.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J., and Dotti, C.G. (1999). The mammalian staufer protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* 19, 288-297.
- Kim, K.C., and Kim, H.K. (2006). Role of Staufer in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci. Lett.* 397, 48-52.
- Kim, K.W., Mutter, R.W., Cao, C., Albert, J.M., Freeman, M., Hallahan, D.E., and Lu, B. (2006). Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 36883-36890.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005). Mammalian Staufer1 recruits Upfl to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.
- Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L., and Maquat, L.E. (2007). Staufer1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J.* 26, 2670-2681.

- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G., and Kiebler, M.A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2945-2953.
- Koster, D.A., Palle, K., Bot, E.S., Bjornsti, M.A., and Dekker, N.H. (2007). Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* *448*, 213-217.
- Kravchenko, J.E., Ilyinskaya, G.V., Komarov, P.G., Agapova, L.S., Kochetkov, D.V., Strom, E., Frolova, E.I., Kovriga, I., Gudkov, A.V., Feinstein, E., *et al.* (2008). Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6302-6307.
- Kreuzaler, P., and Watson, C.J. (2012). Killing a cancer: what are the alternatives? *Nature reviews. Cancer* *12*, 411-424.
- Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* *32*, 683-696.
- Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H.D., Traganos, F., Dai, W., and Darzynkiewicz, Z. (2005). Assessment of ATM phosphorylation on Ser-1981 induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in relation to Ser-139-histone H2AX phosphorylation, cell cycle phase, and apoptosis. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* *68*, 1-9.
- Kusek, G., Campbell, M., Doyle, F., Tenenbaum, S.A., Kiebler, M., and Temple, S. (2012). Asymmetric segregation of the double-stranded RNA binding protein Staufen2 during mammalian neural stem cell divisions promotes lineage progression. *Cell stem cell* *11*, 505-516.
- Kwon, M.J., Nam, E.S., Cho, S.J., Park, H.R., Shin, H.S., Park, J.H., Park, C.H., and Lee, W.J. (2010). E2F1 expression predicts outcome in Korean women who undergo surgery for breast carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 564-571.
- Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O., and Nebreda, A.R. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4341-4351.
- Lal, A., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Kawai, T., Galban, S., Yang, X., Brewer, G., and Gorospe, M. (2006). Posttranscriptional derepression of GADD45alpha by genotoxic stress. *Mol. Cell* *22*, 117-128.
- Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. (2005). Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *EMBO J.* *24*, 1852-1862.

- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J.* *23*, 3092-3102.
- Lambert, J.M., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Soderqvist, M., Segerback, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J. (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer cell* *15*, 376-388.
- Lambert, J.M., Moshfegh, A., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J. (2010). Mutant p53 reactivation by PRIMA-1MET induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene* *29*, 1329-1338.
- Lammens, T., Li, J., Leone, G., and De Veylder, L. (2009). Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol.* *19*, 111-118.
- Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* *141*, 2629-2634.
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S.M., Xiao, Y.J., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., *et al.* (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* *113*, 717-730.
- Laver, J.D., Li, X., Ancevicus, K., Westwood, J.T., Smibert, C.A., Morris, Q.D., and Lipshitz, H.D. (2013). Genome-wide analysis of Staufin-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic Acids Res.*
- Le, S., Sternglanz, R., and Greider, C.W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol. Biol. Cell* *11*, 999-1010.
- Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C.E., Sossin, W., Desgroseillers, L., and Lacaille, J.C. (2008). Staufin1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 2896-2907.
- Lebeau, G., Miller, L.C., Tartas, M., McAdam, R., Laplante, I., Badeaux, F., DesGroseillers, L., Sossin, W.S., and Lacaille, J.C. (2011). Staufin 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn. Mem.* *18*, 314-326.
- Lee, B.K., Bhinge, A.A., and Iyer, V.R. (2011). Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res* *39*, 3558-3573.
- Lee, J., Park, C.K., Park, J.O., Lim, T., Park, Y.S., Lim, H.Y., Lee, I., Sohn, T.S., Noh, J.H., Heo, J.S., *et al.* (2008). Impact of E2F-1 expression on clinical outcome of gastric

- adenocarcinoma patients with adjuvant chemoradiation therapy. *Clin. Cancer Res.* *14*, 82-88.
- Lee, J.S., Leem, S.H., Lee, S.Y., Kim, S.C., Park, E.S., Kim, S.B., Kim, S.K., Kim, Y.J., Kim, W.J., and Chu, I.S. (2010). Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J. Clin. Oncol.* *28*, 2660-2667.
- Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V., and Adam, A. (1998). Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett.* *425*, 266-270.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology* *6*, 443-450.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y., and Chia, W. (1997). Inscuteable and Stauferin mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* *90*, 437-447.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* *15*, 1833-1844.
- Liu, K., Ling, S., and Lin, W.C. (2011). TopBP1 mediates mutant p53 gain of function through NF-Y and p63/p73. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4464-4481.
- Liu, K., Luo, Y., Lin, F.T., and Lin, W.C. (2004). TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev.* *18*, 673-686.
- Liu, X., Li, D., Zhang, W., Guo, M., and Zhan, Q. (2012). Long non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay. *EMBO J.* *31*, 4415-4427.
- Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* *481*, 287-294.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., *et al.* (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* *21*, 187-200.
- Lu, X., de la Pena, L., Barker, C., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2006). Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Res.* *66*, 1052-1061.

- Ludwig, R.L., Bates, S., and Vousden, K.H. (1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4952-4960.
- Luo, M., Duchaine, T.F., and DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem. J.* *365*, 817-824.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* *14*, 641-650.
- Ma, Y., Cress, W.D., and Haura, E.B. (2003). Flavopiridol-induced apoptosis is mediated through up-regulation of E2F1 and repression of Mcl-1. *Molecular cancer therapeutics* *2*, 73-81.
- Ma, Y., Freeman, S.N., and Cress, W.D. (2004). E2F4 deficiency promotes drug-induced apoptosis. *Cancer biology & therapy* *3*, 1262-1269.
- Macchi, P., Brownawell, A.M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I.G., and Kiebler, M.A. (2004). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J. Biol. Chem.* *279*, 31440-31444.
- MacKeigan, J.P., Murphy, L.O., and Blenis, J. (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nature cell biology* *7*, 591-600.
- Mahaney, B.L., Meek, K., and Lees-Miller, S.P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* *417*, 639-650.
- Maher-Laporte, M., Berthiaume, F., Moreau, M., Julien, L.A., Lapointe, G., Mourez, M., and DesGroseillers, L. (2010). Molecular composition of staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain. *PloS one* *5*, e11350.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., and Kiebler, M.A. (2003). Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2100-2105.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews. Cancer* *1*, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer* *9*, 153-166.

- Mannhold, R., Fulda, S., and Carosati, E. (2010). IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. *Drug discovery today* *15*, 210-219.
- Mansfield, K.D., and Keene, J.D. (2009). The ribonome: a dominant force in co-ordinating gene expression. *Biol. Cell* *101*, 169-181.
- Mantovani, F., Tocco, F., Girardini, J., Smith, P., Gasco, M., Lu, X., Crook, T., and Del Sal, G. (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nature structural & molecular biology* *14*, 912-920.
- Marchand, V., Gaspar, I., and Ephrussi, A. (2012). An intracellular transmission control protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 202-210.
- Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortin, J. (1999). A human sequence homologue of Staufén is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2212-2219.
- Markham, D., Munro, S., Soloway, J., O'Connor, D.P., and La Thangue, N.B. (2006). DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. *EMBO reports* *7*, 192-198.
- Markovits, J., Pommier, Y., Kerrigan, D., Covey, J.M., Tilchen, E.J., and Kohn, K.W. (1987). Topoisomerase II-mediated DNA breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and the cell cycle in NIH 3T3 fibroblasts and L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* *47*, 2050-2055.
- Martel, C., Dugre-Brisson, S., Boulay, K., Breton, B., Lapointe, G., Armando, S., Trepanier, V., Duchaine, T., Bouvier, M., and Desgroseillers, L. (2010). Multimerization of Staufén1 in live cells. *RNA* *16*, 585-597.
- Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M.A., and Desgroseillers, L. (2006). Staufén1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem. J.* *393*, 245-254.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., and Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* *182*, 1545-1556.
- Martinez, L.A., Goluszko, E., Chen, H.Z., Leone, G., Post, S., Lozano, G., Chen, Z., and Chauchereau, A. (2010). E2F3 is a mediator of DNA damage-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 524-536.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR

- substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., *et al.* (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 15, 1067-1077.
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D., and Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8354-8359.
- McClelland, M.L., Kallio, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Kestner, C.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Gorbsky, G.J., and Stukenberg, P.T. (2004). The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Curr. Biol.* 14, 131-137.
- Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck, A., Corcos, L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2008). E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ.* 15, 1815-1823.
- Merino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., *et al.* (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol.* 186, 355-362.
- Michelle, L., Cloutier, A., Toutant, J., Shkreta, L., Thibault, P., Durand, M., Garneau, D., Gendron, D., Lapointe, E., Couture, S., *et al.* (2012). Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators. *Mol. Cell. Biol.* 32, 954-967.
- Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Stauf domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* 19, 1366-1377.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11, 577-590.
- Miki, T., Kamikawa, Y., Kurono, S., Kaneko, Y., Katahira, J., and Yoneda, Y. (2011). Cell type-dependent gene regulation by Stauf2 in conjunction with Upf1. *BMC molecular biology* 12, 48.
- Miki, T., and Yoneda, Y. (2004). Alternative splicing of Stauf2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J. Biol. Chem.* 279, 47473-47479.

- Monshausen, M., Gehring, N.H., and Kosik, K.S. (2004). The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular medicine* 6, 127-144.
- Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., and Kindler, S. (2001). Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *J. Neurochem.* 76, 155-165.
- Montes, M., Cloutier, A., Sanchez-Hernandez, N., Michelle, L., Lemieux, B., Blanchette, M., Hernandez-Munain, C., Chabot, B., and Sune, C. (2012). TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell. Biol.* 32, 751-762.
- Moore, M.J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-1518.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* 4, 511-518.
- Muller, P.A., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology* 15, 2-8.
- Munoz, M.J., Perez Santangelo, M.S., Paronetto, M.P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., *et al.* (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* 137, 708-720.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A., and Lu, X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 702-712.
- O'Leary, D.A., Sharif, O., Anderson, P., Tu, B., Welch, G., Zhou, Y., Caldwell, J.S., Engels, I.H., and Brinker, A. (2009). Identification of small molecule and genetic modulators of AON-induced dystrophin exon skipping by high-throughput screening. *PloS one* 4, e8348.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., *et al.* (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T.A., and Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J. Biol. Chem.* 277, 37804-37810.

- Olmos, Y., Brosens, J.J., and Lam, E.W. (2011). Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14, 35-44.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., *et al.* (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677-681.
- Park, E., Gleghorn, M.L., and Maquat, L.E. (2013). Staufen2 functions in Staufen1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 405-412.
- Park, E., and Maquat, L.E. (2013). Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 4, 423-435.
- Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., *et al.* (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nature cell biology* 5, 552-558.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.
- Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., and Vousden, K.H. (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* 11, 1853-1863.
- Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3, 279-296.
- Poehlmann, A., and Roessner, A. (2010). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol. Res. Pract.* 206, 591-601.
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nature reviews. Cancer* 9, 738-748.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., *et al.* (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-723.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews. Cancer* 6, 789-802.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., and Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* 17, 421-433.

- Pothof, J., Verkaik, N.S., van, I.W., Wiemer, E.A., Ta, V.T., van der Horst, G.T., Jaspers, N.G., van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Persengiev, S.P. (2009). MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J.* *28*, 2090-2099.
- Prabhudesai, S.G., Rekhraj, S., Roberts, G., Darzi, A.W., and Ziprin, P. (2007). Apoptosis and chemo-resistance in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* *96*, 77-88.
- Putzer, B.M., and Engelmann, D. (2013). E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends in molecular medicine* *19*, 89-98.
- Putzer, B.M., Stiewe, T., Crespo, F., and Esche, H. (2000). Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther.* *7*, 1317-1325.
- Racek, T., Buhlmann, S., Rust, F., Knoll, S., Alla, V., and Putzer, B.M. (2008). Transcriptional repression of the prosurvival endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BIP by E2F1. *J. Biol. Chem.* *283*, 34305-34314.
- Raff, J.W., Whitfield, W.G., and Glover, D.M. (1990). Two distinct mechanisms localise cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. *Development* *110*, 1249-1261.
- Raleigh, J.M., and O'Connell, M.J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 10)*, 1727-1736.
- Ramachandran, S., Tran, D.D., Klebba-Faerber, S., Kardinal, C., Whetton, A.D., and Tamura, T. (2011). An ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) kinase mediated response to DNA damage down-regulates the mRNA-binding potential of THOC5. *RNA* *17*, 1957-1966.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufien double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J.* *19*, 997-1009.
- Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* *135*, 1441-1455.
- Ravel-Chapuis, A., Belanger, G., Yadava, R.S., Mahadevan, M.S., DesGroseillers, L., Cote, J., and Jasmin, B.J. (2012). The RNA-binding protein Staufien1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* *196*, 699-712.
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* *26*, 731-743.
- Real, S., Espada, L., Espinet, C., Santidrian, A.F., and Tauler, A. (2010). Study of the in vivo phosphorylation of E2F1 on Ser403. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 912-918.

- Reddy, R.K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R.C., Kaufman, R.J., and Lee, A.S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 20915-20924.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer cell* *11*, 175-189.
- Reinhardt, H.C., Hasskamp, P., Schmedding, I., Morandell, S., van Vugt, M.A., Wang, X., Linding, R., Ong, S.E., Weaver, D., Carr, S.A., *et al.* (2010). DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol. Cell* *40*, 34-49.
- Ricci, E.P., Kucukural, A., Cenik, C., Mercier, B.C., Singh, G., Heyer, E.E., Ashar-Patel, A., Peng, L., and Moore, M.J. (2014). Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nature structural & molecular biology* *21*, 26-35.
- Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* *117*, 773-786.
- Riley, K.J., and Steitz, J.A. (2013). The "Observer Effect" in genome-wide surveys of protein-RNA interactions. *Mol. Cell* *49*, 601-604.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology* *9*, 402-412.
- Rinaldo, C., Prodosmo, A., Mancini, F., Iacovelli, S., Sacchi, A., Moretti, F., and Soddu, S. (2007). MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol. Cell* *25*, 739-750.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2004). Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2968-2977.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* *391*, 96-99.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell* *8*, 781-794.
- Sanchez-Carbente Mdel, R., and Desgroseillers, L. (2008). Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog. Brain Res.* *169*, 41-58.

- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1412-1417.
- Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev. Biol.* *113*, 443-448.
- Scoumanne, A., Cho, S.J., Zhang, J., and Chen, X. (2011). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is regulated by RNA-binding protein PCBP4 via mRNA stability. *Nucleic Acids Res* *39*, 213-224.
- Shaked, H., Shiff, I., Kott-Gutkowski, M., Siegfried, Z., Haupt, Y., and Simon, I. (2008). Chromatin immunoprecipitation-on-chip reveals stress-dependent p53 occupancy in primary normal cells but not in established cell lines. *Cancer Res.* *68*, 9671-9677.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325-334.
- Simone, N.L., Soule, B.P., Ly, D., Saleh, A.D., Savage, J.E., Degraff, W., Cook, J., Harris, C.C., Gius, D., and Mitchell, J.B. (2009). Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PloS one* *4*, e6377.
- Singer, S., Zhao, R., Barsotti, A.M., Ouwehand, A., Fazollahi, M., Coutavas, E., Breuhahn, K., Neumann, O., Longerich, T., Pusterla, T., *et al.* (2012). Nuclear pore component Nup98 is a potential tumor suppressor and regulates posttranscriptional expression of select p53 target genes. *Mol. Cell* *48*, 799-810.
- Siprashvili, Z., Webster, D.E., Kretz, M., Johnston, D., Rinn, J.L., Chang, H.Y., and Khavari, P.A. (2012). Identification of proteins binding coding and non-coding human RNAs using protein microarrays. *BMC genomics* *13*, 633.
- Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer cell* *3*, 247-258.
- Sossin, W.S., and DesGroseillers, L. (2006). Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* *7*, 1581-1589.
- St Clair, S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W.J., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., and Manfredi, J.J. (2004). DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol. Cell* *16*, 725-736.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* *66*, 51-63.

- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G., and Jantsch, M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10979-10983.
- Staker, B.L., Hjerrild, K., Feese, M.D., Behnke, C.A., Burgin, A.B., Jr., and Stewart, L. (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15387-15392.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature cell biology* *5*, 401-409.
- Stiewe, T., and Putzer, B.M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* *26*, 464-469.
- Strano, S., and Blandino, G. (2003). p73-mediated chemosensitivity: a preferential target of oncogenic mutant p53. *Cell cycle* *2*, 348-349.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* *30*, 3667-3683.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529-533.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell* *24*, 841-851.
- Sykes, S.M., Stanek, T.J., Frank, A., Murphy, M.E., and McMahon, S.B. (2009). Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *J. Biol. Chem.* *284*, 20197-20205.
- Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y., and Yoshida, K. (2007). DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol. Cell* *25*, 725-738.
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., and Kastan, M.B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* *123*, 49-63.
- Tang, S.J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., and Schuman, E. (2001). A role for a rat homolog of stau68 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* *32*, 463-475.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell* *24*, 827-839.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., and Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by

- massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell cycle* *6*, 1586-1593.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* *9*, 231-241.
- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* *20*, 1803-1815.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., *et al.* (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol. Cell* *43*, 432-448.
- Thoma, C.R., Toso, A., Gutbrodt, K.L., Reggi, S.P., Frew, I.J., Schraml, P., Hergovich, A., Moch, H., Meraldi, P., and Krek, W. (2009). VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nature cell biology* *11*, 994-1001.
- Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Desbats, M.A., Leishman, C.C., and Boccaccio, G.L. (2009). Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* *122*, 563-573.
- Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Loschi, M., Pasquini, J.M., Correale, J., Kindler, S., and Boccaccio, G.L. (2005). Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol. Biol. Cell* *16*, 405-420.
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* *459*, 1010-1014.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* *303*, 844-848.
- Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* *445*, 661-665.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* *187*, 1477-1485.
- Vessey, J.P., Amadei, G., Burns, S.E., Kiebler, M.A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2012). An asymmetrically localized Staufen2-dependent RNA complex regulates maintenance of mammalian neural stem cells. *Cell stem cell* *11*, 517-528.

- Vessey, J.P., Macchi, P., Stein, J.M., Mikl, M., Hawker, K.N., Vogelsang, P., Wieczorek, K., Vendra, G., Riefler, J., Tubing, F., *et al.* (2008). A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16374-16379.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C., and Helin, K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6379-6395.
- Villace, P., Marion, R.M., and Ortin, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* *32*, 2411-2420.
- von Roretz, C., Lian, X.J., Macri, A.M., Punjani, N., Clair, E., Drouin, O., Dormoy-Raclet, V., Ma, J.F., and Gallouzi, I.E. (2013). Apoptotic-induced cleavage shifts HuR from being a promoter of survival to an activator of caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* *20*, 154-168.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* *137*, 413-431.
- Wan, G., Mathur, R., Hu, X., Zhang, X., and Lu, X. (2011). miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 478-484.
- Wang, B., Liu, K., Lin, F.T., and Lin, W.C. (2004). A role for 14-3-3 tau in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 54140-54152.
- Wang, B., Xiao, Z., Ko, H.L., and Ren, E.C. (2010). The p53 response element and transcriptional repression. *Cell cycle* *9*, 870-879.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., and Gorospe, M. (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 760-769.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2220-2230.
- Wu, J., and Liu, L.F. (1997). Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res* *25*, 4181-4186.
- Wu, S., Murai, S., Kataoka, K., and Miyagishi, M. (2008). Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *365*, 75-81.
- Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* *20*, 240-251.

- Xu, E., Zhang, J., and Chen, X. (2013). MDM2 expression is repressed by the RNA-binding protein RNPC1 via mRNA stability. *Oncogene* 32, 2169-2178.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
- Yamaguchi, Y., Oohinata, R., Naiki, T., and Irie, K. (2008). Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells* 13, 583-592.
- Yamakuchi, M., and Lowenstein, C.J. (2009). MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell cycle* 8, 712-715.
- Yan, W., Zhang, J., Zhang, Y., Jung, Y.S., and Chen, X. (2012). p73 expression is regulated by RNPC1, a target of the p53 family, via mRNA stability. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2336-2348.
- Yang, D.Q., Halaby, M.J., and Zhang, Y. (2006). The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* 25, 4613-4619.
- Yu, Z., Fan, D., Gui, B., Shi, L., Xuan, C., Shan, L., Wang, Q., Shang, Y., and Wang, Y. (2012). Neurodegeneration-associated TDP-43 interacts with fragile X mental retardation protein (FMRP)/Staufen (STAU1) and regulates SIRT1 expression in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 287, 22560-22572.
- Zalmas, L.P., Zhao, X., Graham, A.L., Fisher, R., Reilly, C., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2008). DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO reports* 9, 252-259.
- Zhan, Q. (2005). Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat. Res.* 569, 133-143.
- Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332-336.
- Zhang, J., Cho, S.J., Shu, L., Yan, W., Guerrero, I., Kent, M., Skorski, K., Chen, H., and Chen, X. (2011a). Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas. *Genes Dev.* 25, 1528-1543.
- Zhang, J., Jun Cho, S., and Chen, X. (2010). RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, regulates p63 expression through mRNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9614-9619.
- Zhang, X., Wan, G., Berger, F.G., He, X., and Lu, X. (2011b). The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response. *Mol. Cell* 41, 371-383.

- Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P., and Xiao, Z.X. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* 419, 849-853.
- Zhou, B.B., and Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature reviews. Cancer* 4, 216-225.
- Zuckerman, V., Wolynec, K., Sionov, R.V., Haupt, S., and Haupt, Y. (2009). Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J. Pathol.* 219, 3-15.

Annexe I : Liste des contributions à des articles

Article 1 :

Trépanier V, Zhang X, Viranaicken W and DesGroseillers L.

Down-regulation of Staufen2 expression in response to DNA damage.

En préparation.

Article 2:

Boulay K*, Ghram M*, Viranaicken W, **Trépanier V**, Mollet S, Fréchina C and DesGroseillers L.

* Contribution équivalente des auteurs

Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1.

Nucleic Acids Research (2014)

Article 3 :

Martel C*, Dugré-Brisson S*, Boulay K*, Breton B, Lapointe G, Armando S, **Trépanier V**, Duchaine T, Bouvier M and Desgroseillers L.

*Contribution équivalente des auteurs

Multimerization of Staufen1 in live cells.

RNA (2010) 3, p.585-97.