

Université de Montréal

Staufen1 est un régulateur post-transcriptionnel du cycle cellulaire

par Mehdi Ghram

Département de Biochimie et de médecine moléculaire
Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor en biochimie
option Génétique moléculaire

Août 2018

© Mehdi Ghram, 2018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Staufen1 est un régulateur post-transcriptionnel du cycle cellulaire

présentée par :
Mehdi Ghram

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luis Rokeach, président-rapporteur
Dr Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Dr Jean-François Côté , membre du jury
Dr François Bachand, examinateur externe
Dr Mathieu Ferron, représentant de la doyenne de la FESP

Résumé

Le cycle cellulaire est crucial pour la croissance, mais aussi pour le développement. Ce mécanisme est tellement critique que la moindre atteinte faite à l'une de ses étapes peut conduire à des problèmes de croissance et de développement, mais aussi à l'apparition d'anomalies, tels que les cancers, et ultimement la mort. De ce fait, la prolifération cellulaire est un mécanisme finement régulé, évitant au mieux les défaillances et les déséquilibres éventuels. Les mécanismes de régulation des étapes du cycle cellulaire sont rassemblés à plusieurs niveaux, et sont hautement hiérarchisés et structurés : les régulations transcriptionnelle et post-traductionnelle font partie des aspects les mieux étudiés à ce jour. D'autres processus, comme la régulation post-transcriptionnelle, se trouvent moins documentés. Cependant, les découvertes des protéines liant l'ARN, et ayant un rôle clé lors des différentes phases du cycle de division, semblent de plus en plus fréquentes. L'épissage, l'export nucléaire, la localisation, la dégradation et la traduction des ARNm représentent les multiples facettes de la régulation post-transcriptionnelle, et justifient amplement leur importance dans l'affinement du contrôle des différentes phases du cycle cellulaire.

Staufen1 (STAU1), une protéine liant l'ARN, fait partie de ces incroyables découvertes qui ont contribué à révolutionner notre approche de la régulation de l'expression génique, et qui ont aidé à approfondir notre compréhension des mécanismes régissant divers processus cellulaires et physiologiques.

Les travaux de recherche entrepris dans le cadre de cette thèse ont contribué à approfondir nos connaissances sur le rôle de la protéine Staufen1 dans la régulation post-transcriptionnelle du cycle cellulaire et de la prolifération. En occurrence, nous avons identifié un nouveau mécanisme de dégradation de STAU1 en sortie de mitose, impliquant le système ubiquitine-protéasome. Nous avons également montré pour la première fois que STAU1 pourrait inhiber la prolifération tumorale dans le cas du cancer colorectal, et les résultats de nos travaux ont été confirmés et approfondies dans des études ultérieures. Par ailleurs, les résultats de nos approches expérimentales, en vue de l'étude de l'impact de STAU1 sur le contrôle de la prolifération dans des modèles cellulaires non transformées suggèrent fortement un rôle positif dans le développement du potentiel prolifératif en cas de transformation

tumorale. Ces résultats sont en harmonie avec une multitude d'études portant sur le rôle positif de STAU1 dans la régulation de la prolifération et sur son implication dans divers types de cancers. Cependant, l'examen plus exhaustif des études portant sur Staufen1 suggère un modèle multi-mécanistique dans les divers processus carcinogènes, et ouvre un champ d'investigation futur d'une grande ampleur pour élucider les mécanismes moléculaires qui soutiennent les fonctions STAU1 associés à la prolifération cellulaire et le développement tumoral.

Mots-clés : Staufen, cycle cellulaire, prolifération, régulation post-transcriptionnelle

Abstract

The cell cycle is crucial for growth, but also for development. This mechanism is so critical that the slightest damage to one of its stages can lead to problems of growth and development, but also to the appearance of anomalies, such as cancers, and ultimately death. As a result, cell proliferation is a finely regulated mechanism, best avoiding possible failures and imbalances.

The regulation mechanisms of the cell cycle transitions are grouped at several levels, and are highly hierarchical and structured: the transcriptional and post-translational regulations are among the most studied aspects to date. Other processes, such as post-transcriptional regulation, are less documented. However, number of discoveries of RNA-binding proteins, which play a key role in the different phases of the division cycle, is increasing since the past decade. Splicing, nuclear export, localization, degradation and translation of mRNAs represent the multiple aspects of post-transcriptional regulation, and amply justify their importance in refining the control of the different phases of the cell cycle.

Staufen1, an RNA-binding protein, is one of the incredible discoveries that have revolutionized our understanding of gene expression regulation, and has helped deepen our understanding of the mechanisms underlying various cellular and physiological processes.

The research work undertaken during this thesis has contributed to deepening our knowledge of Staufen1 protein function in the post-transcriptional regulation of the cell cycle and proliferation. We have identified a new mechanism of degradation of STAUI during mitosis exist, involving the ubiquitin-proteasome system. We have also shown for the first time that STAUI could inhibit tumor proliferation in colorectal cancer, and our results have been confirmed and extended in later studies. Moreover, the results of our experimental approaches in untransformed cellular models, strongly suggest a positive role of Staufen1 in promoting the proliferative potential during tumorigenesis. . These results are consistent with a multitude of studies showing the positive role of STAUI in the regulation of proliferation and its involvement in various types of cancers. However, more comprehensive review of Staufen1 studies suggests a multi-mechanistic model in the various carcinogenic processes, and opens

up a future field of investigation to elucidate the molecular mechanisms that support the STAU1 functions associated with cell proliferation and tumor development.

Keywords : Staufen, cell cycle, proliferation, post-transcriptional regulation

Tables des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Tables des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
1. Introduction.....	1
1.1. Mécanismes de régulation du cycle cellulaire.....	2
1.1.1. Aperçu du cycle cellulaire.....	2
1.1.1.1. La phase G0.....	3
1.1.1.2. La phase G1.....	4
1.1.1.3. Le point de restriction.....	4
1.1.1.4. La phase S.....	5
1.1.1.5. La phase G2.....	6
1.1.1.6. La phase M ou mitose.....	6
1.1.2. Aperçu de la complexité du réseau régulateur du cycle cellulaire.....	7
1.1.3. Régulation post-traductionnelle.....	10
1.1.3.1. Les complexes Cyclines/CDK.....	10
1.1.3.2. Les complexes SCF et APC : La voie de l'ubiquitine.....	13
1.1.3.3. Les complexes E3 SCF et APC/C : structures et fonctions.....	16
1.1.3.4. Les complexes SCF et APC/C : implications dans la progression du cycle cellulaire.....	18
1.1.4. Régulation transcriptionnelle.....	27
1.1.5. Régulation traductionnelle.....	30
1.1.6. Régulation post-transcriptionnelle.....	33
1.1.6.1. Maturation des ARN.....	34
1.1.6.2. L'export nucléaire.....	36
1.1.6.3. Dégradation de l'ARNm.....	36
1.2. Protéines liant l'ARN, régulateurs post-transcriptionnels et cycle cellulaire.....	42

1.2.1.	Exemples de régulons post-transcriptionnels du cycle cellulaire	45
1.2.1.1.	L'exemple du régulon eIF4E	45
1.2.1.2.	L'exemple du régulon Nup96	45
1.2.1.3.	L'exemple de Nup98.....	46
1.2.1.4.	SLBP : l'exemple parfait	47
1.2.2.	Régulons d'ARN et points de contrôle du cycle cellulaire.....	49
1.3.	Staufen1 un acteur majeur de la régulation post-transcriptionnelle.....	51
1.3.1.	Présentation générale	51
1.3.2.	Un bref historique de l'appellation de Staufen	51
1.3.3.	Staufen est une protéine conservée.....	52
1.3.4.	Structure de Staufen	52
1.3.5.	Localisation cellulaire de STAU1.....	53
1.3.6.	Aperçu de l'aspect multifonctionnel de la protéine Staufen1	54
1.3.7.	Implication de Stau1 dans l'épissage alternatif de pré-ARNm : Cas de la Dystrophie Myotonique de type 1.....	55
1.3.8.	Dégradation de l'ARN médiée par Staufen ou SMD : Mécanisme et implications fonctionnelles	57
1.3.8.1.	Sites de liaison ciblés par le SMD	57
1.3.8.2.	Staufen2 : un partenaire de Staufen1 dans le SMD	58
1.3.8.3.	Relation fonctionnelle entre SMD et NMD	59
1.3.8.4.	Implications biofonctionnelles du SMD	60
1.3.9.	STAU1 et la traduction : influence et implications biologiques.....	62
1.3.9.1.	STAU1 se lie au 5'UTR pour faciliter la traduction.....	63
1.3.9.2.	La liaison de STAU1 aux <i>IRAlu</i> des 3'UTR favorise la traduction en défiant l'activité p54 ^{nrb} et PKR.....	64
1.3.9.3.	Les duplex intramoléculaires impliquent STAU1 dans divers processus.....	65
1.3.9.4.	L'association STAU1-LncRNA stabilise les ARNm cibles.....	66
1.3.10.	STAU1 est un acteur potentiel de la prolifération cellulaire et du développement tumoral.....	67
1.4.	Hypothèses de recherche.....	70
2.	Résultats.....	72

2.1.	Article 1: Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1 ..	72
2.1.1.	Mise en contexte	72
2.1.2.	Abstract	75
2.1.3.	Introduction.....	76
2.1.4.	Materials and methods	78
2.1.5.	Results.....	84
2.1.6.	Discussion.....	92
2.1.7.	Acknowledgment	98
2.1.8.	References.....	99
2.1.9.	Figures legends	107
2.1.10.	Figures.....	112
2.1.11.	Legends to supplementary figures	120
2.1.12.	Supplementary figures	121
2.2.	Article 2: Staufen1 downregulation impairs cell cycle transitions and cell proliferation in untransformed cells.....	123
2.2.1.	Mise en contexte	123
2.2.2.	Abstract	126
2.2.3.	Introduction.....	127
2.2.4.	Material and methods.....	129
2.2.5.	Results.....	132
2.2.6.	Discussion.....	137
2.2.7.	References.....	139
2.2.8.	Figures legends	144
2.2.9.	Figures.....	147
3.	Discussion.....	154
3.1.	La régulation de Staufen1 au cours du cycle cellulaire	155
3.2.	La régulation du cycle cellulaire par Staufen1	156
3.3.	Staufen1 est associé au fuseau mitotique.....	160
3.4.	Rôles de Staufen1 dans la tumorigenèse.....	162
3.4.1.	STAU1 est un frein au développement du cancer colorectal.....	162

3.4.2.	L'effet activateur de Staufen1 sur la prolifération lui confère le statut d'un oncogène : cas du rhabdomyosarcome embryonnaire et alvéolaire.....	163
3.4.3.	Le SMD, un cheval de Troie pour les voies oncogènes : cas du cancer gastrique	165
3.4.4.	Staufen1 intervient dans les processus de développement tumoral : un modèle à trois dimensions	165
	Conclusion	169
	Références.....	i

Liste des figures

Introduction

Figure 1.	Représentation schématique de la quiescence et des quatre phases du cycle cellulaire	3
Figure 2.	Le passage au point de restriction nécessite la présence de facteurs de croissance.	5
Figure 3.	Shéma descriptif des différentes étapes qui constituent la mitose.....	7
Figure 4.	Implication des Cdk/Cyclines, des CKI et des phosphatases Cdc25 dans la régulation du cycle cellulaire.....	8
Figure 5.	Interactions entre mécanismes post-traductionnels et transcriptionnels pour la régulation du cycle cellulaire : exemple de la progression en phase G1.....	9
Figure 6.	Structure des ubiquitine-ligases SCF et APC/C.....	17
Figure 7.	Les substrats des complexes SCF et APC/C au cours du cycle cellulaire Adaptée de.....	19
Figure 8.	APC/C, un complexe régulé et régulateur du cycle cellulaire.....	20
Figure 9.	Mécanismes de régulations par SCF et APC/C durant la mitose.....	25
Figure 10.	L'implication des facteurs E2Fs, RBs, DPs, MuvB et FOXO dans la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.....	29
Figure 11.	Initiation de la traduction dépendante de la coiffe.....	30
Figure 12.	Lien entre les voies de signalisation et le cycle cellulaire via le contrôle traductionnel.....	32
Figure 13.	Les éléments en Cis au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm de la Cycline E1.	32

Figure 14.	Shéma illustrant le cycle de vie des ARNm des Histones et de la protéine SLBP.	48
Figure 15.	Représentation schématique des domaines fonctionnels et structuraux des différents isoformes de STAU1 et STAU2.....	53
Figure 16.	Modèle pour le SMD, impliquant l'hélicase UPF1.....	59
Figure 17.	Mode d'action de STAU1 dans l'activation de l'export nucléaire et de la traduction des ARNm 3'UTR-IRAlu.....	64
Figure 18.	Représentation schématique des analyses fonctionnelles des cibles de STAU1, présentant des duplex intramoléculaires.....	65

Résultats

Article 1

Figure 1.	Stau1 protein levels vary during the cell cycle.....	112
Figure 2.	Stau1 is a substrate of the ubiquitin proteasome system.....	113
Figure 3.	Stau1 down-regulation in mitosis is dependent on the APC/C.....	114
Figure 4.	The N-terminal region of Stau1 is required for its down-regulation by APC/C.....	115
Figure 5.	Expression of Stau155-FLAG3 impairs mitosis entry.....	116
Figure 6.	Stau155-FLAG3 expression impairs cell proliferation.....	117
Figure 7.	Microarray analyses of Stau1-transfected HEK293T cells in prometaphase.....	118
Figure 8.	RT-qPCR validation of microarray data using selected mRNAs.....	119
Supplementary figure 1.	Quantification of cell cycle markers of figure 1A.....	121
Supplementary figure 2.	Stau155-FLAG3 expression does not induce cell death or cell cycle exit.....	122

Article2

Figure 1. STAU1 downregulation impairs cell proliferation.....147

Figure 2. STAU1 downregulation does not cause cell cycle exit.....148

Figure 3. Knockdown of STAU1 expression leads to the accumulation of cells in G1 phase.....149

Figure 4. STAU1 downregulation impairs S phase entry.....150

Figure 5. STAU1 silencing modulates gene expression of cell cycle regulators in hTERT-RPE1 cells.....151

Figure 6. STAU1 is required for proper mitosis transit.....152

Figure 7. STAU1 localizes to the mitotic spindle during metaphase.....153

Discussion

Figure 1. Expérience préliminaire montrant que l’association entre Staufen1 et les polysomes varient en fonction du cycle cellulaire.....158

Figure 2. Schéma explicatif de l’implication de Staufen1 dans les différents processus de la tumorigenèse.....167

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

APC/C: Complexe promoteur d'anaphase/cyclosome

Arf1: "ADP-ribosylation factor 1"

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

Cdk: Kinase dépendante des cyclines

DM1 : Dystrophie musculaire myotonique de type 1

DMPK : Protéine kinase dystrophia myotonica

dsRBD: Domaine de liaison à l'ARN double-brin

DUB: "Deubiquitinating enzymes"

eEF: Facteur d'élongation eucaryote

IRES: Site interne d'entrée du ribosome

kDa: kiloDalton

MCC: "Mitotic checkpoint complex"

miARN: MicroARN

mTOR: "Mamalian target of rapamycin"

NMD: Dégradation induite par codon non-sens

PolyA: Polyadénosine

PTC: Codon stop prématuré

RNP: Particule ribonucléoprotéique

RT-qPCR: Transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase quantitative

SAC: "Spindle Assembly Checkpoint"

SBS: Site de liaison de Stau1

SCF: Complexe SKP1-Cul1-protéine F-box

SDS-PAGE: Gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SMD: "Staufen mediated decay"

SnRNP: Petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires

SR: Protéines riches en sérines et arginines xviii

Stau: Staufen

TBD: Domaine de liaison à la tubuline

Thr: Thréonine

Tyr: Tyrosine

UTR: Région non traduite

À mes parents, qu'ils reposent en paix

Remerciements

Je me rends compte que je suis en train de franchir une étape importante de ma vie. Une expérience qui a été haute en couleurs, riche en émotions, semées de beaucoup d'épreuves, et surtout riche en rencontres intéressantes. Bref une aventure humaine qui m'a beaucoup appris tant sur le plan scientifique que dans les relations humaines. Écrire cette thèse n'aurait pas été possible sans l'intervention, le soutien, ou même la présence de certaines personnes. Les remercier serait donc la moindre des choses.

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, Luc DesGroseillers, qui m'a accueilli dans son laboratoire, et qui a gardé depuis, la porte de son bureau ouverte sans conditions. Sa patience, son sens de l'écoute et sa disponibilité ont été pour moi un canot de sauvetage à certaines périodes où les épreuves et les difficultés ont failli semer le doute sur ma volonté de continuer mon parcours.

Je remercie la Mission Universitaire de Tunisie à Montréal (MUTAN) qui m'a permis de continuer mes études en épargnant les coûts majorés et supplémentaires pour étudiants étranger. Cette subvention m'a été d'un grand soutien financier durant mon programme d'études. Je remercie également la faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'université de Montréal pour les bourses qu'elle m'a octroyées.

Je voudrais également exprimer ma gratitude envers Sylvie Beauchemin, qui n'est plus avec nous au département de Biochimie, pour sa sollicitude et sa grande efficacité, ainsi que Kathie Gierka qui nous facilite la vie au quotidien, et quand vient le temps des inscriptions.

Mes remerciements vont aux anciens du laboratoire. Karine, la première à m'avoir accueilli dans le laboratoire et avec laquelle j'ai eu la chance de collaborer longtemps. Nos discussions sur la science ont certainement entretenu ma flamme pour la recherche, et ton dévouement pour le travail a été pour moi un exemple à suivre. Véronique avec qui j'ai tant discuté sur des choses et d'autres de la vie. Merci pour ta gentillesse, ta sensibilité et ton ouverture. Merci à Stéphanie, Rémy et Xhin, les stagiaires postdoctoraux, avec qui j'ai certainement beaucoup appris.

Je remercie également tous ceux encore présents dans le laboratoire, et que j'ai eu la chance de côtoyer. Je pense à Sami Hsine, qui a montré beaucoup de motivation dès son arrivée au laboratoire et qui a tant progressé en si peu d'années. J'espère que tu réaliseras tes objectifs, dans et en dehors du laboratoire. Je pense également à Yulemi Gonzalez qui a aussi fourni beaucoup d'efforts pour s'adapter au projet et qui n'hésite pas à poser les bonnes questions pour apprendre et progresser. Lionel et Florence, je n'ai pas eu vraiment le temps de vous côtoyer mais je vous souhaite beaucoup de succès dans vos travaux.

Je ne peux pas oublier Steve Ly, un stagiaire que j'ai eu le plaisir de former, et qui m'a laissé une formidable impression. Je te remercie pour ta motivation, ton dynamisme et ta rigueur, et te souhaite beaucoup de succès dans tes études en pharmacie.

Je ne peux omettre de parler de toutes ces formidables rencontres que j'ai faites durant ma thèse. Je pense particulièrement aux effectifs d'autres laboratoires comme celui de Gerardo Ferbeyre, Pascal Chartrand et Steven Michnick. Merci à Frédéric Lessard pour sa passion, son dévouement et son ouverture. Nos discussions de couloirs m'ont toujours été d'une grande inspiration. Merci également à Xavier pour son sérieux et sa disponibilité. Enfin, je remercie Jacqueline Kowarzyk pour son extrême gentillesse et sa droiture.

Je n'aurai pas pu écrire cette thèse sans le soutien indéfectible de mes amis proches. Anouar, Ryad, Kacem, Atef et Wejih. Je vous remercie tous du fond du cœur pour votre amitié sincère, profonde et inconditionnelle.

Mes deux sœurs Mariem et Molka ont toujours été mes plus grands fans. Je vous dédie cette thèse pour vous exprimer ma gratitude et vous remercier de votre profonde tendresse. Je suis aussi votre plus grand fan et vous admire pour votre patience et votre force.

Cette thèse est un hommage à mes parents Rachid et Samira, que leurs âmes reposent en paix. Vous m'aviez tout donné, sans conditions, et vous viviez dans l'espoir de me voir réaliser mes rêves. J'espère que je contribue, un tant soit peu à votre bonheur là où vous êtes.

Pour conclure, je souhaite dédier cette thèse à mon âme sœur et ma partenaire de vie, mon épouse Kaouther Fatnassi, qui a toujours été une source d'inspiration et de réconfort, une oreille attentive, un soutien moral et un roc face à toutes les tempêtes de la vie. J'espère que

réussir cette étape de ma vie sera pour nos deux enfants Omar et Nour, une source d'inspiration dans leur parcours.

1. Introduction

Le cycle cellulaire représente un mécanisme universel de duplication des cellules vivantes. Les étapes qui le constituent varient de par leur nature et leur durée d'une espèce à l'autre. Chez l'humain, le cycle cellulaire est crucial pour la croissance, mais aussi pour le développement. Ce mécanisme est tellement critique que la moindre atteinte faite à l'une de ses étapes peut conduire à des problèmes de croissance et de développement, mais aussi à l'apparition d'anomalies, telles que les cancers, et ultimement la mort. De ce fait, la prolifération cellulaire est un mécanisme finement régulé, évitant au mieux les défaillances et les déséquilibres éventuels. Les mécanismes de régulation des étapes du cycle cellulaire sont rassemblés à plusieurs niveaux, et sont hautement hiérarchisés et structurés : les régulations transcriptionnelle et post-traductionnelle font partie des aspects les mieux étudiés à ce jour. D'autres processus, comme la régulation post-transcriptionnelle, se trouvent moins documentés. Cependant, les découvertes des protéines liant l'ARN, et ayant un rôle clé lors des différentes phases du cycle de division, semblent de plus en plus fréquentes. L'épissage, l'export nucléaire, la localisation, la dégradation et la traduction des ARNm représentent les multiples facettes de la régulation post-transcriptionnelle, et justifient amplement leur importance dans l'affinement du contrôle des différentes phases du cycle cellulaire.

Dans cette section, il sera question de passer en revue les différents modes de régulation du cycle cellulaire. Explorant plus en détails les aspects qui caractérisent le contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique et leur impact sur la prolifération cellulaire, cette partie se focalisera enfin sur l'objet principal des travaux associés à cette thèse, la protéine liant l'ARN Staufen1.

1.1. Mécanismes de régulation du cycle cellulaire

La division cellulaire dans les cellules humaines est similaire à celle chez les autres eucaryotes, en ce sens qu'elle implique une série d'événements moléculaires commandés et étroitement contrôlés.

Afin de s'assurer que la cellule traverse d'une manière sécuritaire et efficace toutes les étapes du cycle cellulaire, et engendrer deux cellules filles saines et identiques, plusieurs mécanismes de régulation sont mis en œuvre de manière concertée, interactive et synchronisée. Nous ne parlons plus de voies de signalisation isolées et linéaires, mais bien de réseaux de signalisation complexes et enchevêtrés, où toutes les voies de signalisation se croisent, se rejoignent, s'entrecroisent et fusionnent. Stimuli mitogènes, cascades de phosphorylations/déphosphorylations, cycle de dégradation protéolytique, programmes transcriptionnels et régulation traductionnelle : tous ces processus de contrôle interagissent dans le temps et dans l'espace et mettent en jeu des effecteurs clés et beaucoup d'énergie afin de tracer et de baliser la progression des cellules tout le long du cycle de division. Nous essaierons dans les prochaines sections de passer en revue quelques-uns de ces processus de régulation du cycle cellulaire.

1.1.1. Aperçu du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose de cinq phases distinctes: trois phases d'attente - G₀, dans laquelle les cellules restent dans un état de quiescence ou de repos, - G₁ et G₂, au cours desquelles se produisent la synthèse d'ARN et la synthèse de protéines; - la phase S, pendant laquelle l'ADN est répliqué; - et la phase M, dans laquelle les cellules subissent la mitose et la cytokinèse (figure 1). Les phases G₀, G₁, S et G₂ sont désignés collectivement comme l'interphase (c'est-à-dire entre deux mitoses).

Certaines cellules du corps restent au repos pendant toute leur vie et ne subissent pas de division cellulaire. Cependant, la stimulation de la cellule par des facteurs externes tels que les mitogènes fait que ces cellules quiescentes peuvent retourner dans le cycle cellulaire et subir une division. La liaison d'une molécule de facteur de croissance à son récepteur de surface cellulaire peut stimuler un certain nombre de voies de signalisation, comme par

exemple, la voie protéine kinase (MAPK) dépendante de Ras qui joue un rôle majeur dans l'entrée en G1. Une fois les cellules entrées en G1, la synthèse des ARNm et des protéines nécessaires à la synthèse de l'ADN se produit, permettant aux cellules d'entrer en phase S.

Pour assurer une progression normale, il existe un certain nombre de points de contrôle tout au long des phases du cycle cellulaire. Ainsi, le premier point de contrôle, appelé point de restriction (R), agit tard à la fin de la phase G1 afin de s'assurer que la cellule soit en mesure de dupliquer son ADN. Une fois que les cellules ont passé ce cap, elles sont engagées sur la voie de la division cellulaire. D'autres points de contrôle agissent en phase S afin d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN au besoin et à la transition G2/M pour s'assurer que les cellules ne soient pas endommagées et qu'elles aient répliqué correctement leur matériel génétique avant la mitose. Finalement, la mitose elle-même est surveillée par un mécanisme qui assure que la cellule remplit toutes les conditions pour finaliser la cytokinèse.

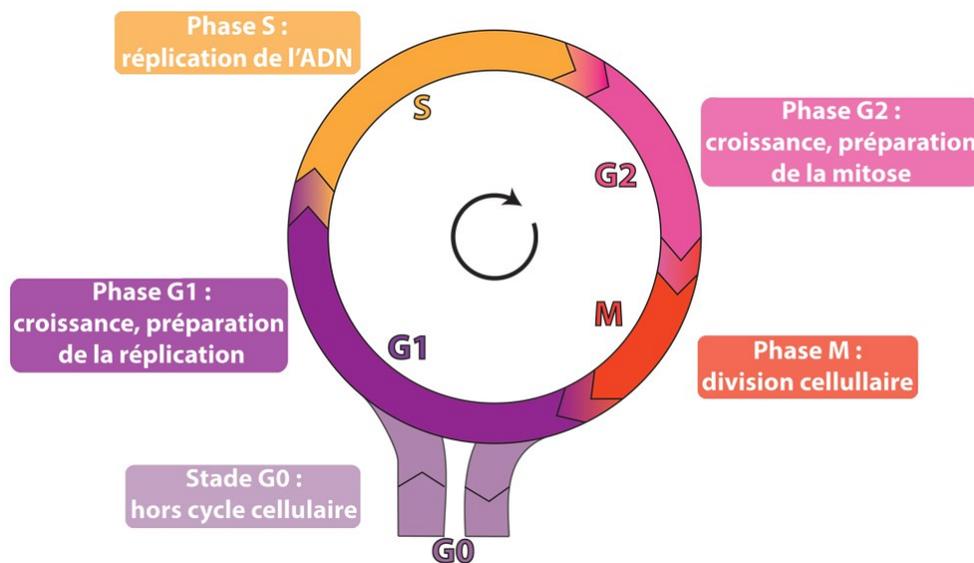


Figure 1. Représentation schématique de la quiescence et des quatre phases du cycle cellulaire (1).

1.1.1.1. La phase G0

Quand les cellules reçoivent des signaux anti-mitogènes ou quand les agents mitogènes se font discrets dans le milieu, les cellules quittent le cycle cellulaire et entrent généralement dans une phase statique qu'on appelle la quiescence. La phase G0 survient *in vitro*, quand le milieu de culture est dépourvu de facteurs de croissance. Mais certains contestent l'appellation

de quiescence et parlent plutôt de « cellules arrêtées après privation de sérum avec un contenu en ADN de phase G1 » (2) . Plus rarement, une quiescence peut être associée à la phase G2. Cela se produit chez des cellules avec des phases G2 particulièrement longues comme les lymphocytes. En général, des marqueurs spécifiques de la phase G0 n'existent pas vraiment, même si on utilise la statine, une protéine nucléaire de 57KDa (3). On peut également discriminer les cellules quiescentes des cellules en G1 en mesurant l'activité transcriptionnelle, celle-ci étant généralement beaucoup plus faible en G0 (4).

1.1.1.2. La phase G1

La phase G1 (pour GAP1 ou Jonction 1) est définie comme le premier cap atteint par la cellule après la division cellulaire. La phase G1 est une phase pendant laquelle la cellule décide de sortir du cycle, d'attendre, de se différencier ou de proliférer. Deux déterminants jouent un rôle crucial lors de cette phase : la croissance cellulaire et les facteurs environnementaux et physiologiques (agents mitogènes, disponibilité des nutriments, hormones, augmentation de la taille cellulaire). La croissance cellulaire représente le processus par lequel la cellule arrive à « une taille et un poids normaux ». L'environnement, lui, est primordial car il régule la balance entre facteurs de croissance et facteurs de différenciation pour orienter la décision de la cellule vers son destin. Tous ces facteurs ne restent décisifs pour la cellule que pour un certain temps. Après quoi, quand les conditions favorables sont réunies, la cellule s'engage d'une manière irréversible dans le processus de division. La perte de sensibilité aux facteurs exogènes, associée à la projection de la cellule dans la phase de synthèse de l'ADN définit le point de restriction R chez les eucaryotes supérieurs, y compris l'humain (5, 6). Au-delà de cette transition, la cellule achève son cycle cellulaire, indépendamment des facteurs environnementaux.

1.1.1.3. Le point de restriction

Travaillant sur les cellules de poulet, Temin et al ont montré en 1971 que l'influence des signaux mitogènes disparaissait déjà plusieurs heures avant l'entrée en phase S (7). Pardee et al. ont approfondi l'étude de ce phénomène et ont introduit le terme point de restriction R. R étant le moment de G1 après lequel les cellules peuvent proliférer indépendamment des stimuli extérieurs (5).

Les cellules qui sortent de mitose, qu'on appelle cellules post-mitotiques (pm), interrompent brutalement leur progression en G1 si les facteurs de croissance et les signaux mitogènes viennent à disparaître du milieu de culture, ou si la synthèse protéique est inhibée. Néanmoins, après un certain temps après la mitose, les cellules ne s'arrêtent plus, même si les facteurs mitogènes sont retirés du milieu, mais progressent et achèvent un cycle complet. On distingue donc les cellules G1-pm (cellules post-mitotiques arrêtées par la privation en facteurs de croissance) et les cellules G1-ps (préphase S) qui sont capables d'initier la réplication de leur ADN en absence de facteurs mitogènes. La frontière qui sépare la phase G1-pm et la phase G1-ps est appelée communément en anglais *commitment* ou le point de restriction : c'est l'engagement irrévocable de la cellule vers un cycle chromosomique complet (8).

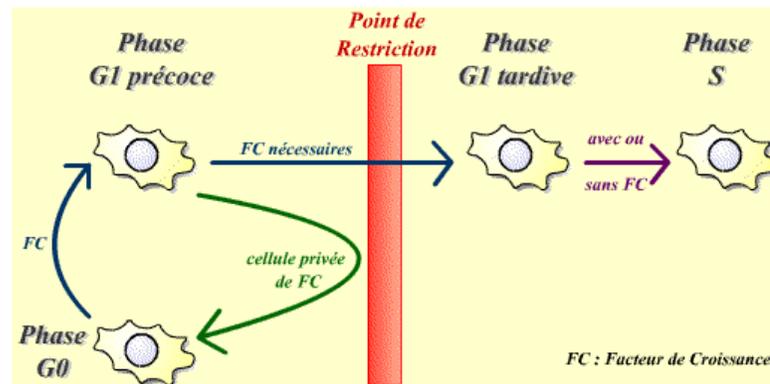


Figure 2. Le passage au point de restriction nécessite la présence de facteurs de croissance (9).

1.1.1.4. La phase S

La phase S correspond à la phase de synthèse de l'ADN (réplication des chromosomes à l'identique). Le brin néo-synthétisé étant exactement complémentaire à la matrice. Sa durée, peu variable, dépend principalement de la quantité d'ADN à répliquer et du nombre de sites de réplication actifs. Ainsi, elle se trouve particulièrement allongée chez les cellules polyploïdes (ayant un bagage chromosomique en excès). La synthèse de l'ADN est coordonnée avec celle des histones. Les ARNm des histones sont générés au cours de la phase S puis détruits immédiatement après la réplication. Cette phase se caractérise par la fin de synthèse des autres ARNm(10).

1.1.1.5. La phase G2

La phase G2 (Gap 2) est un intervalle court, ne dépassant pas 4-5 heures en moyenne. Elle débute à la fin de la phase de réplication de l'ADN. La cellule renferme alors le double de la quantité d'ADN régulière : c'est une cellule tétraploïde. Il s'agit d'une période tampon, au cours de laquelle la cellule se donne le temps de vérifier et de réparer d'éventuelles erreurs commises lors de la phase S. Cette transition permet également à la cellule de se préparer à la division mitotique (augmentation de la masse cellulaire, synthèse d'éléments nécessaires à la mitose). Un certain nombre de facteurs essentiels sont synthétisés à ce stade, particulièrement ceux nécessaires à la condensation des chromosomes comme les protéines SMC (Structural Maintenance of chromosomes) (11). Au cours de cette phase, il se produit aussi la phosphorylation des histones H1, qui intervient dans la condensation des chromosomes (12).

1.1.1.6. La phase M ou mitose

Il s'agit de la phase au bout de laquelle, une cellule se divise pour donner deux cellules filles. Elle se compose classiquement de 5 étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase (figure 3). Brièvement, au cours de la mitose, l'enveloppe nucléaire se désagrège, les chromosomes se condensent et prennent la forme d'entités indépendantes (prophase). Les deux organisateurs de microtubules, ou corps polaires, se déplacent pour se trouver chacun de part et d'autre du matériel chromosomique. Des faisceaux de microtubules se développent à partir des corps polaires pour former le fuseau mitotique. Quelques-uns de ces microtubules s'attachent aux kinetochores des chromosomes qui, ainsi attachés, s'alignent alors sur la plaque métaphasique dans un plan situé à mi-chemin entre les corps polaires (prométaphase et métaphase). Lorsque la cellule est sûre de la bonne position et du bon attachement des chromosomes, un signal est donné pour débiter l'anaphase. Les chromosomes commencent à se déplacer vers les pôles qui s'éloignent d'ailleurs l'un de l'autre. Les chromosomes regroupés aux pôles cellulaires forment une masse compacte hyperchromatique. La reconstruction du noyau peut alors commencer et l'enveloppe nucléaire se reforme (télophase). La cytokinèse (ou cytocinèse) achève la division de la cellule en produisant deux cellules filles. Grâce à ce mécanisme, les deux cellules filles possèdent un

matériel génétique identique à celui de la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G1, terminant ainsi le cycle cellulaire.

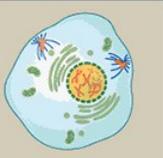
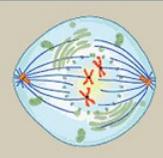
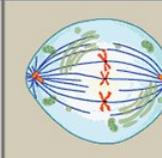
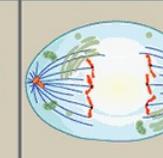
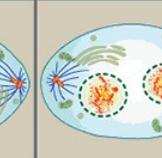
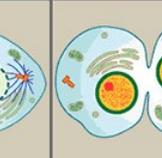
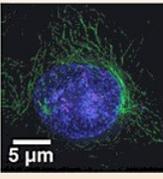
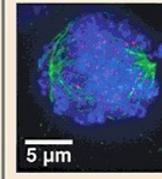
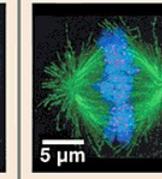
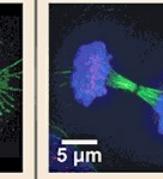
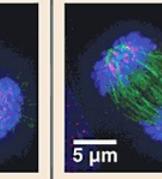
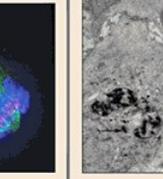
Prophase	Prométaphase	Métaphase	Anaphase	Télophase	Cytocinèse
					
<ul style="list-style-type: none"> • L'ADN se condense et les chromosomes deviennent visibles (chacun est formé de 2 chromatides sœurs) • Les fibres du fuseau mitotique se forment entre les deux centrosomes de la cellule • L'enveloppe nucléaire se désagrège • Les centrosomes se déplacent vers les pôles opposés de la cellule 	<ul style="list-style-type: none"> • L'ADN des chromosomes continue à se condenser • Les kinétochores se forment sur les centrosomes des chromosomes • Des microtubules s'allongent à partir des 2 centrosomes et vont s'attacher aux kinétochores 	<ul style="list-style-type: none"> • Les chromosomes sont localisés au milieu de la cellule, formant la plaque métaphasique. • Les chromatides sœurs sont attachées à des microtubules différents venant de pôles opposés 	<ul style="list-style-type: none"> • Le centromère de chaque chromosome est coupé en deux • Les chromatides sœurs s'éloignent l'une de l'autre, tirée chacune vers l'un des pôles de la cellule. Elles sont maintenant appelées chromosomes des cellules filles • Les fibres du fuseau mitotique s'étirent et allongent la cellule 	<ul style="list-style-type: none"> • Les chromosomes arrivent aux pôles de la cellule et leur ADN commence à se décondenser • Des membranes nucléaires s'organisent autour de chaque groupe de chromosomes • Les microtubules reliés aux kinétochores se désagrègent • Les fibres du fuseau mitotique continuent à écarter les pôles l'un de l'autre 	<ul style="list-style-type: none"> • Cas des cellules animales: un sillon de clivage se forme pour séparer les deux cellules filles • Cas des cellules végétales: une nouvelle paroi se forme au milieu de la cellule mère et elle finit par être divisée en deux
					

Figure 3. Schéma descriptif des différentes étapes qui constituent la mitose (13)

1.1.2. Aperçu de la complexité du réseau régulateur du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire eucaryote est un processus étroitement régulé qui dépend de l'activation et de l'inactivation ordonnées d'une série de Ser/Thr kinases appelées kinases cycline-dépendantes (CDK) (14, 15). Les CDK ne sont actives qu'après association avec certaines cyclines (16), dont la synthèse et la dégradation sont étroitement contrôlées au cours du cycle cellulaire (17). Divers complexes Cycline-CDK sont impliqués dans la régulation des différentes phases : les complexes Cycline D-CDK4/6 contrôlent la progression en G1, Cycline E-CDK2 l'entrée de la phase S, Cycline A-CDK2 la progression de la phase S,

et Cycline A/B-CDK1 la transition G2/M. Le complexe Cycline B-CDK1 actif est le facteur promoteur de la mitose (MPF) (18).

En plus de sa modulation par la sous-unité de cycline, l'activité de CDK est régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation/déphosphorylation et l'association à un groupe de protéines inhibitrices appelées collectivement CKI (16, 19, 20). Une classe de CKI, composée de p21, p27 et p57, se lie et inhibe des complexes Cycline E-CDK2, tandis que l'autre classe d'inhibiteurs de CDK, Ink4, p15, p16 et p18, se lie à CDK4/6 et empêche leur activation par la cycline D.

Les différents complexes Cycline-CDK sont activés durant une fenêtre temporelle spécifique et régulent plusieurs effecteurs critiques en aval par phosphorylation ciblée. Cette activation séquentielle provoque l'activation de divers événements biochimiques caractéristiques de chaque étape du cycle cellulaire et déclenche l'entrée dans la phase suivante (figure 4).

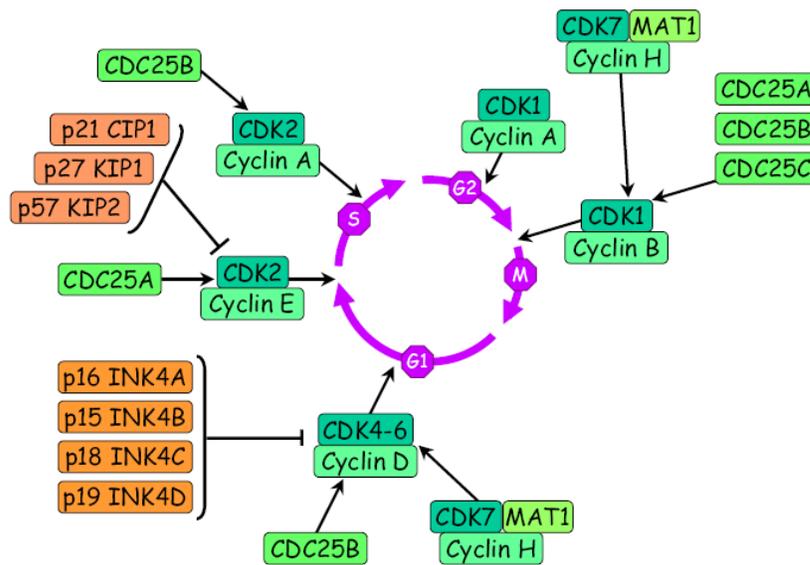


Figure 4. Implication des CDK-Cycline, des CKI et des phosphatases CDC25 dans la régulation du cycle cellulaire (21).

Chez les cellules au repos (G0), l'activation de la transcription de la cycline D en réponse aux mitogènes est considérée comme la première étape pour conduire une cellule vers la division. La protéine cycline D s'associe alors à CDK4/6 et initie la progression en G1 (22).

La cycline D est une protéine très instable et ceci maintient en partie l'exigence d'une synthèse continue, et donc de la présence de mitogènes à ce stade. Les principales cibles de Cycline D-CDK4/6 sont les membres de la famille de la protéine suppresseur de tumeur (RB) du rétinoblastome, qui jouent un rôle central dans la progression en G1. Sous sa forme hypophosphorylée, RB interagit et réprime la famille des facteurs de transcription E2F (22). E2F, en association avec des protéines DP (DP1 et DP2 chez les mammifères), régulent l'expression de divers gènes critiques pour la transition G1/S. Sous sa forme phosphorylée, Rb se dissocie du complexe E2F-DP qui peut alors activer de nombreux gènes nécessaires pour la progression G1/S et la phase S, incluant la cycline E et la cycline A, respectivement appelées cyclines des phases G1/S et S (20). La cycline E-CDK2 (également Cycline A-CDK2) peut encore phosphoryler RB en la maintenant inactive et en produisant une boucle de retour positif qui permet à la cellule d'atteindre le point de restriction, s'affranchissant ainsi de la barrière des facteurs mitogènes, pour passer à la phase S (figure 5).

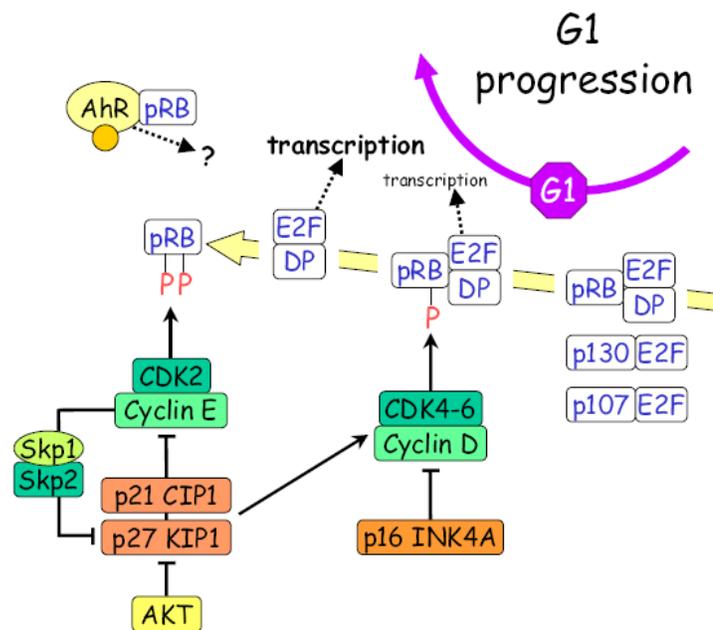


Figure 5. Interactions entre mécanismes post-traductionnels et transcriptionnels pour la régulation du cycle cellulaire : exemple de la progression en phase G1 (21).

Lorsqu'ils sont activés, les Cycline E-CDK2 et Cycline A-CDK2, spécifiques de la phase G1/S et S, phosphorylent les substrats en aval, non seulement pour déclencher les

événements du cycle cellulaire suivant, mais aussi pour éliminer les obstacles à la progression G1. Par exemple, Cycline E-CDK2 phosphoryle p27, un inhibiteur de Cycline E-CDK2 qui empêche la progression de G1/S, induisant sa dégradation (23). Il phosphoryle aussi les facteurs impliqués dans la réplication de l'ADN, y compris Mcm 2-7, Cdc7, Cdc6 et Cdt1, permettant aux cellules à la fois d'entrer et ensuite d'achever la phase S. À la fin de la phase S, les cellules entrent en G2, définie comme une période sans réplication de l'ADN avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes et l'entrée en mitose. La sortie de G2 en phase M nécessite le passage à travers le point de contrôle G2/M, ce qui conduit alors à l'activation de complexes Cycline-CDK associés à phase M, en l'occurrence cycline A-CDK1 et Cycline B-CDK1. Ces Cycline-CDK de la phase M entraînent la cellule vers le point de contrôle suivant appelé le point de contrôle métaphase/anaphase, où les cellules s'assurent de l'assemblage du fuseau et de l'alignement chromosomique sur la plaque métaphasique. Lors de la transition métaphase-anaphase, le complexe promoteur d'anaphase (APC) est activé, entraînant une dégradation de la Cycline A et B, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la cohésion des chromosomes. Un processus de dégradation protéolytique faisant intervenir une forme spécifique de polyubiquitination des cibles. Il en résulte alors la séparation des chromatides sœurs, la sortie de la mitose et la cytokinèse.

1.1.3. Régulation post-traductionnelle

Le précédent aperçu nous a permis de percevoir l'importance des modifications post-traductionnelles dans le processus de régulation des effecteurs qui contrôlent le cycle cellulaire. Nous approfondirons dans les deux prochaines sections notre vision de cette place qu'occupe entre autres la phosphorylation - avec le rôle central des complexes cycline/Cdk – et l'ubiquitination – avec l'étude du cycle protéolytique couplé au cycle cellulaire.

1.1.3.1. Les complexes Cyclines/CDK

Chez la levure (*S. pombe* et *S. cerevisiae*), tous les événements du cycle cellulaire sont contrôlés par une seule CDK appelée CDK1 qui est également appelée Cdc2 (*S. pombe*) et Cdc28 (*S. cerevisiae*). L'activité et la spécificité de substrat de cette kinase sont contrôlées par différentes cyclines à différents stades du cycle cellulaire. Chez les eucaryotes multicellulaires, il existe plusieurs CDK ainsi que plusieurs Cyclines. Chez les mammifères, il

existe quatre protéines principales de type CDK qui jouent un rôle direct dans la régulation du cycle cellulaire. Deux de ces CDK, CDK1 et CDK2 contrôlent les transitions du cycle cellulaire et opèrent principalement aux phases M et S, respectivement. En plus de ceux-ci, deux autres CDK appelées CDK4 et CDK6 sont impliqués dans le contrôle de l'entrée du cycle cellulaire en réponse aux signaux extracellulaires. Un autre membre de la famille, CDK7, est impliqué indirectement dans la régulation du cycle cellulaire en agissant comme kinase activatrice de CDK et agit également par la phosphorylation.

L'activation de tous les CDK nécessite la liaison des cyclines et, dans la plupart des cas, une activation complète nécessite également une phosphorylation d'un résidu thréonine près du site actif de la kinase. Au cours du cycle cellulaire, la synthèse périodique et la dégradation ciblée rapide de différentes cyclines sont des mécanismes majeurs qui entraînent de façon irréversible la progression du cycle cellulaire en modifiant l'activité de différents complexes Cycline-CDK.

La plupart des informations sur la structure des CDK ont été obtenues à partir des structures cristallisées de CDK2, Cycline E-CDK2 et Cycline A-CDK2 (24, 25). Les CDK, qui ont une structure à deux lobes comme les autres kinases, sont inactifs en l'absence de Cyclines en raison de deux modifications structurelles. Le site actif des CDK est présent dans une fente enterrée entre ces deux lobes. L'ATP se lie profondément dans la fente avec ses phosphates orientés vers l'extérieur. La protéine substrat interagit normalement avec l'entrée de cette fente du site actif. Mais en l'absence de cyclines, cette région est bloquée par une grande boucle flexible appelée boucle T ou boucle d'activation.

Comme mentionné ci-dessus, l'activation complète d'une CDK nécessite la phosphorylation d'un résidu de thréonine près du site actif de la kinase (Thr161 dans CDK1, Thr162 dans CDK2). Dans les cellules de mammifères, cette phosphorylation peut se produire après la liaison à la cycline et incite la boucle en T à s'aplatir et à interagir plus largement avec la cycline partenaire. En outre, cette phosphorylation augmente l'interaction avec le substrat au niveau de la séquence cible CDK SPXK/R (26). La phosphorylation de Thr160 activatrice est catalysée par des enzymes appelées kinases activatrices de CDK (CAK) (17).

Ces enzymes sont constamment actives pendant le cycle cellulaire et ne sont pas régulées par une quelconque voie du cycle cellulaire connue. Par conséquent, c'est la liaison de cycline mais non la phosphorylation d'activation qui est considérée comme l'étape hautement régulée et limitant l'activation des CDK, *in vivo*.

Bien que la phosphorylation d'activation ne soit pas régulée, deux phosphorylations inhibitrices sur Tyr15 et Thr14 ont un rôle significatif dans la régulation de l'activité de CDK. Ces résidus sont présents au-dessus du site de liaison à l'ATP de la kinase et leurs phosphorylations introduisent une inhibition en interférant avec l'orientation des phosphates de l'ATP. L'état de phosphorylation de ces deux résidus est régulé par des effets antagonistes de kinases et de phosphatases. Wee1/Mik1 est la kinase qui introduit la phosphorylation inhibitrice de Tyr15. Aussi chez les vertébrés, une autre kinase appelée Myt1 peut phosphoryler Tyr15 et Thr14. La déphosphorylation de ces sites inhibiteurs est médiée par une famille de phosphatases appelée CDC25 (27).

Ces phosphorylations inhibitrices sont particulièrement importantes dans la régulation de l'activation de CDK au début de la mitose et ont également été mises en jeu dans l'activation de la phase G1/S et S. Au cours de la phase S tardive et G2, la cycline B s'accumule et s'associe à CDK1, mais le complexe Cycline B-CDK1 reste inactif en raison de ces phosphorylations inhibitrices. À la transition G2/M, il y a une forte augmentation de l'activité de CDC25C et une diminution de l'activité de Wee1, ce qui déclenche une augmentation rapide de l'activité Cycline B-CDK1, et provoque l'entrée de la phase M. En outre, l'élimination des phosphorylations inhibitrices est importante pour l'activation des complexes Cycline-CDK2 pour la progression de phase G1/S et S.

Chez les vertébrés, la famille des CDC25 compte trois membres, CDC25A, CDC25B et CDC25C. Leur niveau d'activité diffère tout au long du cycle cellulaire (28). CDC25 est principalement impliquée dans l'activation de Cycline-CDK2 pour permettre la transition G1/S ainsi que la progression en S, et peut également participer à l'activation de Cycline-CDK1 en G2/M. L'expression et l'activité de CDC25B commencent à augmenter à la phase S tardive pour atteindre son apogée en G2, ce qui laisse penser à un rôle important dans l'activation de Cycline-CDK en G2/M. Enfin, bien que l'expression de CDC25C ne change pas

significativement pendant le cycle cellulaire, son activité atteint un pic en G2/M et déclenche la phase M en activant Cycline B-CDK1.

La séquence cible optimale pour la reconnaissance par CDK1/2 *in vitro* a été établie comme S/TPXK/R avec une exigence absolue de la proline à la position +1 et un besoin moins strict d'un résidu chargé positif à la position +3. Bien que la séquence de S/TPXK/R semble être un site cible de consensus CDK (29), il est clair que différentes Cycline-CDK montrent des différences dans la spécificité du substrat (30, 31).

Les sous-unités cyclines sont impliquées dans le raffinement du ciblage du substrat par la sous-unité CDK centrale. Par exemple, chez les mammifères, Cycline A-CDK mais non Cycline B-CDK peuvent phosphoryler la protéine p107 associée à pRb. Il est également établi que les cyclines de la phase S, la cycline E et la cycline A, sont impliquées dans la spécificité du substrat en se liant spécifiquement à différents substrats au motif RXL pour amener la Cdk à la proximité du substrat. En plus des inhibiteurs de CDK p21 et p27 (32, 33), il a été montré que plusieurs régulateurs clé du cycle cellulaire tels que E2F1, p107, p130, pRb, p53 et Cdc6 utilisaient certains motifs RXL afin de recruter des Cycline-CDK pour des événements spécifiques de phosphorylation (34).

En résumé, il devient clair que les événements spécifiques de phosphorylation/déphosphorylation qui surviennent tout au long du cycle cellulaire sont cruciaux pour permettre à la cellule de passer au travers de toutes les transitions et que les complexes Cyclines-CDK, en coordination avec d'autres kinases/phosphatases y occupent une place centrale.

1.1.3.2. Les complexes SCF et APC : La voie de l'ubiquitine

Outre la phosphorylation spécifique, une composante majeure de la régulation du cycle cellulaire consiste en la dégradation sélective et temporelle des acteurs critiques par la voie de l'ubiquitine.

L'émergence de la modification des protéines par l'ubiquitine, et par ce qu'on appelle les "Ubiquitine-like", comme un processus critique de régulation a été d'une importance capitale dans l'étude des différents aspects de la vie cellulaire durant les quelques décennies passées. D'autant plus que le prix Nobel en chimie a été accordé pour la découverte du

système Ubiquitine-protéasome et ce, en 2004. A partir de là, les découvertes touchant les protéines ubiquitinées et les enzymes impliquées dans le système ubiquitine ne cessent de se succéder, révélant de plus en plus un rôle extrêmement important de cette modification dans la vie de la cellule.

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés, décrite pour la première fois en 1975. Elle se présente sous forme globulaire et est trouvée soit en tant que monomère libre dans le cytosol, soit liée de façon covalente (liaison amide) à elle-même ou à d'autres protéines. L'ubiquitine a d'abord été mise en évidence pour sa participation à la protéolyse réalisée par le protéasome (adapté de (35)).

L'ubiquitine possède une structure relativement complexe qui permet des interactions protéines-protéines. Pour certains, l'ubiquitination constituerait une modification post-traductionnelle des protéines aussi importante que la phosphorylation. Ainsi, outre son rôle dans la dégradation protéasomique, l'ubiquitine participe à la transduction du signal qui régule le cycle cellulaire, l'endocytose, la transcription, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la réponse immune. L'ubiquitine est conjuguée aux protéines sur lesquelles elle se fixe par une liaison peptidique entre l'extrémité carboxy-terminale d'un de ses résidus glycine (G76) et l'extrémité amino-terminale des lysines acceptrices portées par les protéines cibles. L'ubiquitine possède elle-même 7 résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) qui, chacun, permet son auto-polymérisation et la formation de chaînes de différents types. L'ubiquitination des protéines peut être de différents types. Ainsi, est observée la fixation covalente d'un seul résidu ubiquitine (monoubiquitination et monoubiquitination multiple) ou la conjugaison de chaînes de résidus ubiquitine (polyubiquitination) (35).

Dans une chaîne polyubiquitine, chaque ubiquitine se lie à la précédente en établissant un pont peptidique entre son résidu glycine carboxy-terminal (G76) et un résidu lysine (K48, K63...) de l'ubiquitine précédente. Les chaînes les plus représentées et étudiées dans les cellules sont les chaînes K48 (35).

La fixation d'une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitination) constitue un signal important dans la signalisation intracellulaire en participant aux processus d'endocytose (exemple l'internalisation des récepteurs à tyrosine-kinase) et aux phénomènes d'adressage des

protéines entre les différents compartiments cellulaires. La monoubiquitination est aussi impliquée dans la régulation de la compaction de la chromatine et dans la réparation de l'ADN (ubiquitination des différents acteurs de la réparation, par exemple PCNA [*Proliferating Cell Nuclear Antigen*]). Dans le cas d'une chaîne polyubiquitinée, la disposition des résidus de l'ubiquitine dans la chaîne n'est pas anodine et le signal ainsi constitué modifie fortement le devenir de la protéine porteuse de la chaîne. Ainsi, les chaînes K48 et K29 sont impliquées dans l'adressage des protéines pour la dégradation protéasomique. Une chaîne de tétraubiquitines K48 est le signal minimal pour une reconnaissance efficace par le protéasome. Les chaînes K11 et K63 sont, quant à elles, impliquées dans d'autres processus comme la réparation des lésions de l'ADN, l'endocytose, la régulation d'activités enzymatiques ou le contrôle du cycle cellulaire (35).

L'ubiquitination des protéines cellulaires est réalisée par trois classes d'enzymes: une enzyme activant l'ubiquitine (E1), une enzyme de conjugaison d'ubiquitine (E2) et une ligase d'ubiquitine protéine.

L'ubiquitine est tout d'abord activée par la formation d'une liaison thioester à une enzyme d'activation (*ubiquitin-activating enzyme* ou E1) en présence d'ATP. Chez les eucaryotes, la réaction d'activation se déroule en deux étapes : la formation initiale d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate est suivie de la réaction de cet intermédiaire avec le résidu cystéine de l'E1 pour former un pont thioester. L'ubiquitine ainsi activée est ensuite transférée aux enzymes de type E2.

Au cours d'une réaction de transthiolation, l'ubiquitine activée est transférée de l'enzyme E1 vers un résidu cystéine d'une enzyme de conjugaison E2 (*ubiquitinconjugating enzyme*). Chez les Mammifères, plus d'une centaine de protéines ont été identifiées comme membre de la famille E2. Toutes ces enzymes possèdent un domaine conservé d'environ 150 acides aminés contenant le résidu cystéine nécessaire à leur activité.

L'étape suivante dans la cascade d'ubiquitination des protéines correspond au recrutement spécifique de la protéine à dégrader et au transfert de l'ubiquitine sur cette protéine substrat. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille E3 ou ubiquitine-ligases. L'ubiquitine ligase est une protéine ou un complexe protéique capable de se lier à

l'enzyme E2 et à la protéine à dégrader. L'interaction avec le substrat peut être directe ou peut se faire par l'intermédiaire des protéines adaptatrices. Sur la base de leurs motifs caractéristiques, il existe deux grands groupes de ligases E3: le domaine RING et le domaine HECT E3 (35).

Les E3s possédant un domaine HECT (Homologous to the E6-AP Carboxy-Terminus) possèdent un rôle catalytique. L'ubiquitine activée est transférée de l'E2 sur un résidu cystéine de l'enzyme E3 avant d'être conjuguée à un groupement amino-terminal d'une lysine de la protéine cible. L'extrémité NH₂- terminale de ces enzymes E3 est très variable et est responsable de la reconnaissance spécifique du substrat.

Les E3 possédant un domaine RING, contiennent soit un doigt annulaire (RING finger) intrinsèque, soit une sous-unité de protéine RING associée, essentielle à l'activité de l'ubiquitine ligase. On a montré que plusieurs ligases de type E3 RING, y compris SCF (Skp1–Cul1–F-box protein complex) et APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire (35).

1.1.3.3. Les complexes E3 SCF et APC/C : structures et fonctions

Le complexe SCF se compose d'une protéine d'échafaudage Cul1, de la protéine RING Rbx1, qui recrute finalement l'E2 et de Skp1 (protéine associée à la kinase en phase S 1), qui sert d'adaptateur pour lier la protéine F-box, la sous-unité de liaison au substrat (figure 6) (36).

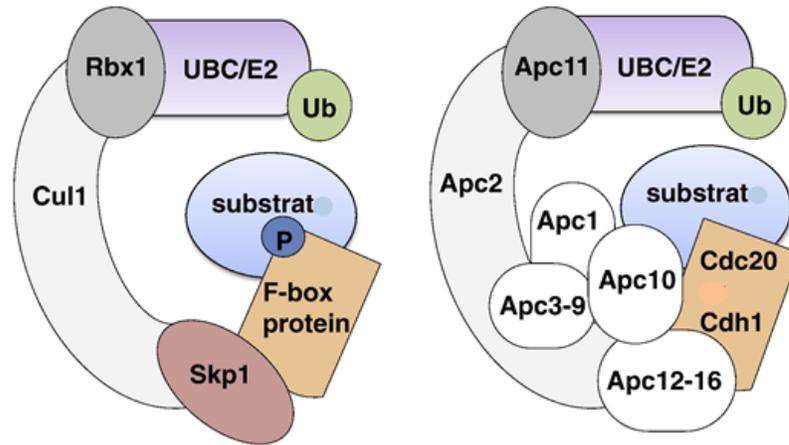


Figure 6. Structure des ubiquitine-ligases SCF et APC/C. Adaptée de (37)

Les protéines F-box sont nommées d'après le domaine F-box, un motif de 40 acides aminés initialement identifié dans la cycline F (Fbxo1), qui se lie à Skp1 (38). Les protéines F-box contiennent un motif supplémentaire qui constitue le domaine de liaison au substrat. Selon ces domaines, elles sont classées en trois groupes. Les protéines F-box contenant des domaines WD-40 sont appelées Fbxw, tandis que celles contenant des répétitions riches en leucine sont appelées Fbxl. Les protéines F-box restantes, avec d'autres motifs (par exemple, les répétitions kelch, les motifs riches en proline) sont nommées Fbxo (39).

Soixante-neuf protéines F-box différentes sont codées par le génome humain, et les protéines F-box individuelles peuvent reconnaître différents substrats. Par conséquent, ces protéines permettent un spectre très large de substrats pour les complexes SCF. Il est important de noter que des substrats spécifiques ou des activités biologiques ont jusqu'à présent été affectés à seulement quelques protéines F-box, et chacun d'entre eux joue un rôle clé dans des processus cellulaires essentiels tels que le contrôle de la croissance et la stabilité génomique (40, 41).

L'autre enzyme E3 à domaine RING, l'APC/C, se compose de treize sous-unités différentes et, dans les cellules somatiques, de deux co-activateurs: CDC20 et CDH1 (également connus sous le nom de Fzr1) qui définissent la spécificité du substrat et s'associent au cœur du complexe APC/C à des stades définis du cycle cellulaire (figure 6) (42). Alors que les ligases SCF peuvent être actives tout au long du cycle cellulaire, l'activité APC/C est limitée au temps entre la métaphase et la fin du G1 suivant : APC/C-Cdc20 initie une sortie

anaphasique, tandis que APC/C-CDH1 contribue à la sortie mitotique et l'établissement d'un état G1 stable (40, 43).

Dans ce qui suivra, nous décrirons la compréhension actuelle de la façon dont les ligases E3, SCF et APC/C régulent la progression du cycle cellulaire ainsi que leur réponse aux signaux environnementaux dans chaque phase du cycle.

1.1.3.4. Les complexes SCF et APC/C : implications dans la progression du cycle cellulaire

Les complexes Ubiquitine-ligases SCF et APC/C sont les régulateurs centraux du cycle protéolytique des effecteurs du cycle cellulaire. Un mécanisme de contrôle post-traductionnel finement régulé dans le temps et dans l'espace ou, en plus de s'entre-réguler, ces deux complexes agissent sur une pléiade de protéines cibles dépendamment des phases et des transitions du cycle cellulaire. Le mode d'action de ces deux complexes protéiques va dépendre de la reconnaissance de domaines bien spécifiques au niveau des substrats. Cette reconnaissance est généralement influencée dans la plupart des cas par l'état de phosphorylation de ces domaines (figure 7).

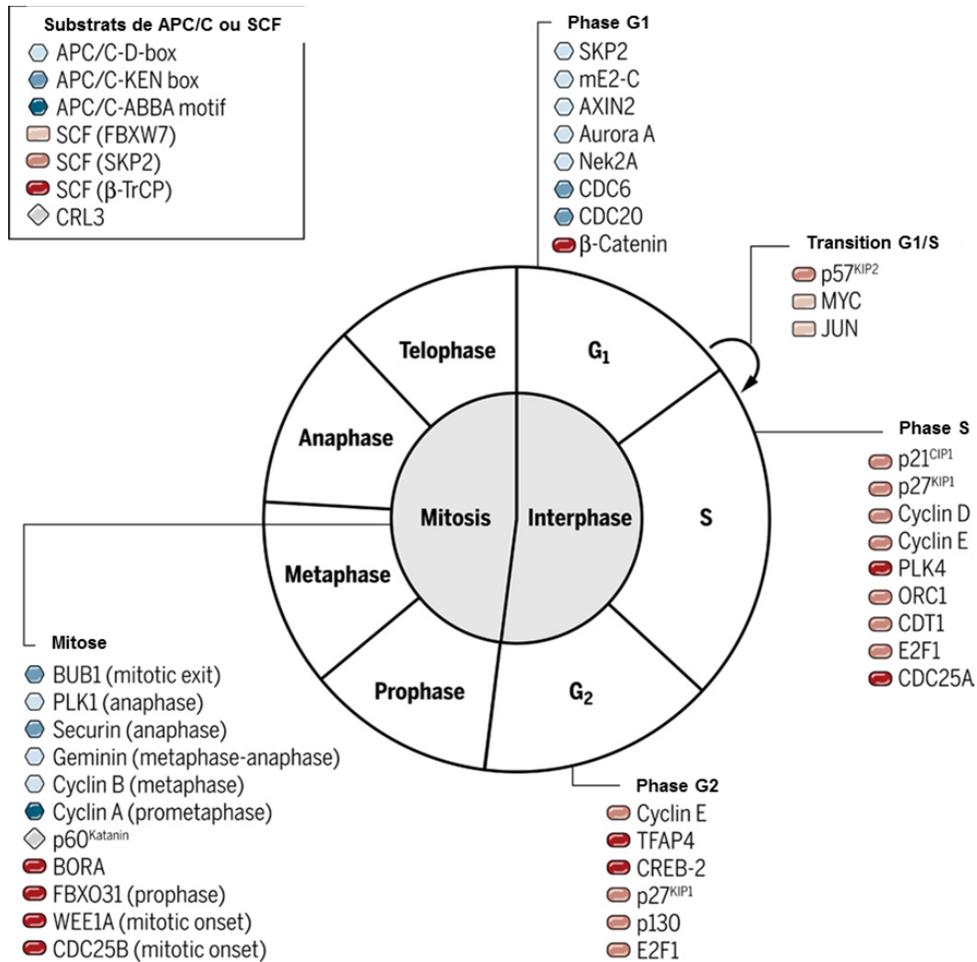


Figure 7. Les substrats des complexes SCF et APC/C au cours du cycle cellulaire. Adaptée de (44).

Les phases G0 et G1 : En réponse au retrait des facteurs mitogènes (ou après la sortie de la mitose), un état G0 ou G1 stable doit être établi. Le complexe APC/C-CDH1 joue un rôle central dans cette tâche, et il est activé en mitose tardive pour terminer la sortie mitotique et réinitialiser le cycle cellulaire en ciblant une variété de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la progression du cycle et la mitose (figure 8). Parmi les cibles qui favorisent la réplication de l'ADN se trouve Cdc6, qui se lie au complexe de reconnaissance d'origine (ORC) pour former des complexes de pré-réplication (preRCs). Cdc6 est maintenu à des niveaux faibles au début G1 grâce à la dégradation induite par APC/C-CDH1 (45). L'APC/C-CDH1 régule également négativement la transduction du signal pro-prolifératif en ciblant Ets2, un facteur de transcription impliqué dans la signalisation de Ras/Raf-MAPK qui induit l'expression de la cycline D1 (46). L'activité APC/C-CDH1 empêche également

l'accumulation précoce de régulateurs du cycle cellulaire positifs (43). Plus précisément, SKP2 (protéine 2 associée à la kinase en phase S) est ciblé pour la protéolyse afin d'éviter la formation prématurée du complexe SCF-SKP2, qui favorise la progression du cycle cellulaire en ciblant la dégradation des CKI (47). Il est important de noter que la phosphatase CDC25A, qui favorise l'entrée en phase S et la mitose par déphosphorylation et donc activation de Cdk2 et CDK1, est également maintenue à des niveaux faibles au début de G1 par APC/C-CDH1 (48). Enfin, APC/C-CDH1 cible les protéines mitotiques pour la dégradation protéasomique (42, 43, 49). Parmi les cibles les plus visibles figurent la cycline A et la cycline B, les principaux moteurs de l'entrée mitotique. En outre, Aurora A, Aurora B, et la kinase polo-like 1 (Plk1), des kinases mitotiques importantes impliquées dans la maturation des centrosomes, l'assemblage du fuseau et la séparation des chromosomes, sont des cibles supplémentaires de l'APC/C- CDH1 (50-52).

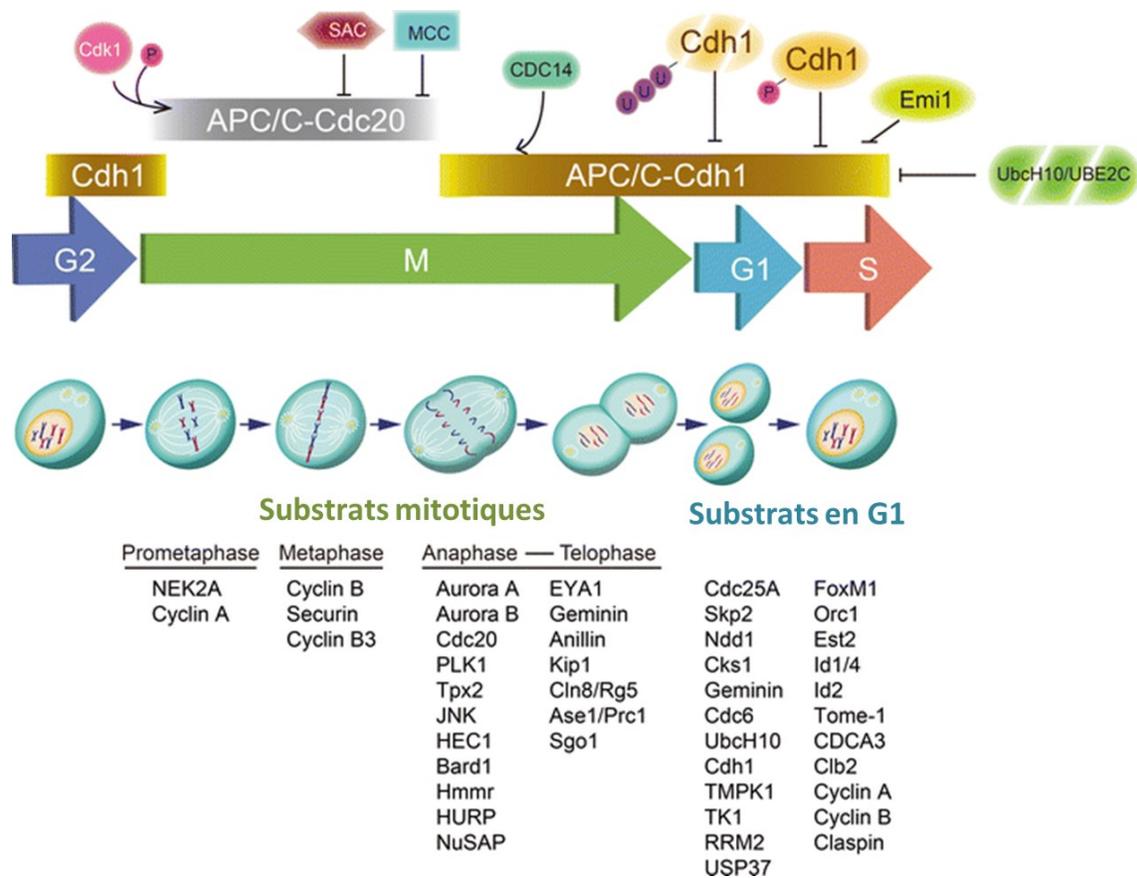


Figure 8. APC/C, un complexe régulé et régulateur du cycle cellulaire. Adaptée de (53).

En réponse au retrait de mitogènes, les cellules doivent également passer à un état d'économie nutritionnelle et restreindre la traduction des protéines et la croissance cellulaire pour maintenir la survie. SCF-Fbxo9 contribue à ce processus via la régulation différentielle de la signalisation mTORC1 et mTORC2. En particulier, les protéines Tel2 (télomère de maintien 2) et Tti1 (protéine interagissant avec Tel2), composantes intégrales des complexes mTORC1 et mTORC2, sont phosphorylées par CKII pour les cibler pour la dégradation par SCFF-bxo9 lors du retrait des facteurs de croissance. Cette voie cible spécifiquement Tel2 et Tti1 dans le complexe mTORC1 (54). En conséquence, la signalisation de mTORC1 est atténuée pour restreindre la traduction des protéines et la croissance cellulaire, mais via le soulagement de l'inhibition de la rétroaction médiée par mTORC1, la signalisation de mTORC2 est maintenue pour favoriser la survie (54).

En réponse aux mitogènes, si les facteurs de croissance et les nutriments sont disponibles, les cellules répondent avec un certain nombre d'événements qui mènent à la croissance et, éventuellement, à la division cellulaire. Certaines ligases SCF sont fortement impliquées dans l'orchestration des réponses aux facteurs de croissance pendant la phase G1. Par exemple, le suppresseur de tumeur PDCD4 (protéine de mort cellulaire programmée 4), qui inhibe le facteur d'initiation de traduction eIF4A, est dégradé en réponse à des mitogènes par un mécanisme à deux étapes. Tout d'abord, PDCD4 est phosphorylé sur la sérine 67 (et éventuellement les résidus de sérine adjacents) par S6K1, et il est ensuite ubiquitiné par SCF- β TrCP, ce qui entraîne une synthèse protéique accrue et une croissance cellulaire (55). En réponse aux mitogènes et aux signaux de survie, SCF- β TrCP favorise également la survie en ciblant la protéine proapoptotique BimEL pour la dégradation d'une manière dépendante de Rsk1/2 et Erk1/2 (56). Une autre cible importante de SCF- β TrCP dans la réponse aux facteurs de croissance est l'inhibiteur mTOR DEPTOR. Après stimulation mitogène, DEPTOR est phosphorylée par mTORC1 ou mTORC2 et CK1 α , ce qui implique l'ubiquitination et la dégradation, soulageant l'inhibition mTOR (57). Ainsi, en coopération avec SCF- β TrCP, la signalisation mTOR favorise une activation supplémentaire de mTOR via cette boucle d'auto-amplification.

Post-point de restriction et transition G1/S : Avec une stimulation mitogène suffisante et la croissance cellulaire, les cellules s'engagent dans la division cellulaire, en passant le point

de restriction. La transition de la phase G1 à la phase S résulte de la diminution de l'activité APC/C-CDH1, de la diminution des taux de CKI, de l'augmentation de l'expression des cyclines, de l'augmentation de l'activité des CDK, de la phosphorylation et de l'inactivation des membres de la famille des protéines Rb (rétinoblastome) et de l'activation des membres de la famille du facteur de transcription E2F.

L'inactivation de l'APC/C-CDH1 pendant la progression vers la phase G1 tardive se fait par différents mécanismes (figure 8). Tout d'abord, UbcH10, l'enzyme conjuguant l'ubiquitine E2 spécifique d'APC/C, est ubiquitinée par APC/C-CDH1, fournissant ainsi une boucle de rétroaction négative limitant l'activité APC/C-CDH1 (58). De même, Cdh1 initie l'autoubiquitination de l'APC/C, limitant ainsi son activité (59). De plus, les niveaux croissants d'activité CDK conduisent à la phosphorylation de CDH1, perturbant sa liaison à l'APC/C (40). Enfin, lors de la transition G1/S, le facteur de transcription E2F induit l'expression de Emi1 (une protéine F-box également connue sous le nom de Fbxo5), qui se lie à APC/C-CDH1 comme pseudo-substrat, inhibant APC/C-CDH1 en S et en G2 (60).

Avec la diminution de l'activité APC/C-CDH1 à la fin de G1, SKP2 s'accumule et forme le complexe SCF-SKP2 qui cible les inhibiteurs du cycle cellulaire pour la dégradation (figure 7), favorisant la progression du cycle cellulaire à travers S, G2 et M (61). Par exemple, SCF-SKP2 se lie à p27 et favorise sa dégradation protéasomique, libérant la cycline E-CDK2 de l'inhibition exercée par p27 (62). La dégradation d'autres CKI ubiquitinés par SCF-SKP2, comme p21 et p57, renforce l'activation de cycline-CDK1/2. Ces fonctions définissent Skp2 comme une ligase E3 avec des propriétés oncogéniques, ce qui est encore soutenu par la surexpression fréquente de SKP2 dans de nombreuses tumeurs (63).

Les phases S et G2 du cycle cellulaire : Cycline E-CDK2 et, plus tard, cycline A-CDK2, sont les deux principaux complexes CDK en phase S et sont les principaux facteurs d'initiation de la duplication d'ADN et des centrosomes. En même temps, la cycline A-CDK2 inhibe encore APC/C-CDH1 via la phosphorylation de CDH1, pour assurer la stabilité des cyclines (58). Une fois l'entrée en phase S réussie, la cycline D1 est phosphorylée par GSK3 β , et donc ciblée pour la dégradation par une ligase SCF (64). À mesure que les cellules progressent à travers S et approchent G2, les niveaux de cyclines de phase S diminuent à nouveau. Notamment, l'abondance de la cycline E est régulée par une boucle de rétrocontrôle négative.

Plus précisément, à mesure que l'activité de Cdk2 augmente, la cycline E liée au CDK2 est phosphorylée sur la thréonine 380 d'une manière dépendante de CDK2, après quoi la cycline E est phosphorylée et ciblée pour la dégradation par le complexe SCF-Fbw7 (65).

Pendant les phases S et G2, il est crucial pour les cellules d'assurer une réplication exacte et complète de l'ADN. Par conséquent, les mécanismes de détection des dommages à l'ADN et les points de contrôle fournissent une surveillance précise. En cas d'endommagement de l'ADN, la kinase ATM active la kinase de contrôle CHK2 et la kinase ATR active CHK1 dans un processus dépendant de Claspin. CHK1 et CHK2 induisent alors la phosphorylation inhibitrice de CDC25A. CDC25A favorise l'activation du cycle cellulaire en raison de sa capacité à éliminer les phosphorylations inhibitrices de CDK1 et CDK2, mais la phosphorylation de CDC25A par CHK1/2 conduit à son ubiquitination par SCF- β TrCP et à sa dégradation, atténuant l'activité de CDK. La dégradation de CDC25A conduit à une pause dans la progression du cycle cellulaire pendant S ou G2, selon le moment des dommages à l'ADN. Une pause nécessaire pour déclencher les mécanismes de réparation de l'ADN (66).

Une autre cible du point de contrôle des dommages à l'ADN en phase G2 est PLK1. En réponse aux lésions de l'ADN, la phosphatase CDC14B est libérée du nucléole au nucléoplasme où elle déphosphoryle Cdh1. En conséquence, le complexe APC/C-CDH1 est réactivé pour cibler PLK1 pour dégradation. De cette façon, Claspin et Wee1 sont stabilisés pour activer le point de contrôle et inhiber la progression du cycle cellulaire (67).

Phase G2 et transition G2/M : Après l'achèvement réussi et précis de la réplication de l'ADN, la production de désoxyribonucléotides (dNTP) doit être arrêtée. À cette fin, RRM2 (ribonucleotide reductase family member 2), qui convertit les ribonucléotides en dNTP pour la synthèse de l'ADN, est phosphorylé sur la thréonine 33 par les CDK, et ubiquitiné par le complexe SCF-Cycline F, ce qui réduit la disponibilité des dNTP (68). En revanche, la cycline F est régulée négativement en réponse aux lésions de l'ADN d'une manière dépendante de l'ATR pour stabiliser le RRM2. De ce fait, la production de dNTP est améliorée pour permettre une réparation efficace de l'ADN (68).

Au-delà de la réplication de l'ADN, le complexe SCF-Cycline F, qui est impliqué dans la connexion de la voie AKT au cycle cellulaire (69), régule également la duplication des

centrosomes, et particulièrement CP110, une protéine essentielle pour la duplication des centrosomes, associée physiquement aux centrioles pendant G2. En ciblant le CP110 pour la dégradation protéasomique, SCF-Cycline F s'assure que les centrosomes ne sont répliqués qu'une seule fois pendant le cycle cellulaire, ce qui empêche la surduplication des centrosomes, un phénomène qui pourrait entraîner des fuseaux mitotiques multipolaires ou asymétriques et des aberrations chromosomiques subséquentes (70).

Avec la progression vers la phase G2, la cellule se prépare à l'entrée en mitose. Cette phase est orchestrée par la cycline B-Cdk1. En fin de phase G2, SCF- β TrCP favorise l'activation de Cdk1 en induisant la dégradation de Wee1, une kinase inhibitrice de Cdk1.

Pour empêcher une entrée mitotique prématurée, l'activation précoce de la cycline B-CDK1 doit être évitée. À cette fin, le SCF-NIPA cible la cycline nucléaire B1 pendant S et G2 (71). Cependant, à la fin de G2, NIPA est phosphorylé à la sérine 395 par la cycline B-CDK1, après phosphorylation initiale sur la sérine 354 et la sérine 359 par Erk2. La phosphorylation inhibe l'assemblage du complexe fonctionnel SCF-NIPA, permettant l'accumulation nucléaire de la cycline B1 et l'entrée mitotique subséquente. Dans ce contexte, la cycline B1 régule sa propre abondance par une boucle de rétroaction positive (72).

La phase mitotique : Cycline B-CDK1 est essentielle à la progression des étapes précoces de la mitose, y compris l'assemblage du fuseau mitotique, la rupture de l'enveloppe nucléaire, la cessation de la transcription des gènes, et la condensation des chromosomes. Ces processus conduisent la cellule à travers la prophase jusqu'à la métaphase.

A partir de la métaphase, l'APC/C devient un acteur clé dans la promotion de la progression mitotique et, éventuellement, la sortie mitotique. Ainsi, les mécanismes inhibiteurs qui contrôlent l'APC/C dans les phases S et G2 doivent être supprimés (figure 9). À cet égard, SCF- β TrCP est un médiateur de l'ubiquitination et de la dégradation de l'inhibiteur de APC/C, Emi1, suite à sa phosphorylation par la cycline B-CDK1 et PLK1 (73). Cependant, jusqu'à ce que tous les kinétochores soient correctement attachés au fuseau et que les chromosomes soient correctement alignés sur la plaque métaphasique, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC) inhibe l'activation de l'APC/C, bloquant le passage à l'anaphase. En présence de kinétochores non attachés, les protéines mitotiques de contrôle, BubR1, Bub3

et MAD2, se lie à CDC20 pour former le complexe mitotique de régulation (Mitotic Checkpoint Complex -MCC), qui séquestre CDC20 et inhibe directement l'activation de l'APC/C-CDC20 (74). Un autre modèle suggère que Cdc20 est ciblé pour la dégradation par APC/C de manière dépendante de MCC pendant l'activation du SAC (75). De plus, la phosphorylation inhibitrice de CDC20 par des protéines kinases, comme Cdk1, MAPK ou Bub1, contribue à l'inhibition de CDC20 pendant l'activation du SAC. De façon intéressante, la transcription de MAD2 est également régulée par SCF- β TrCP. Au cours de la fin de G2, SCF- β TrCP cible REST (Repressor-Element-1-Silencing Transcription factor) pour la dégradation (figure 9), permettant la dérégulation transcriptionnelle de MAD2 (76).

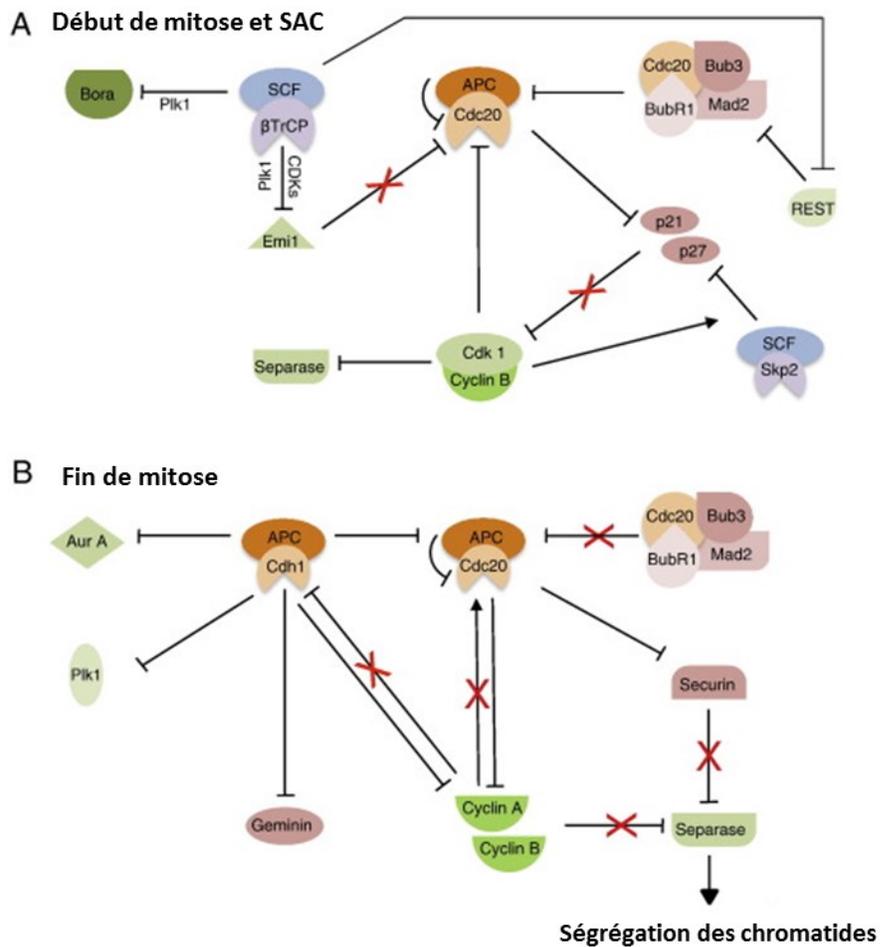


Figure 9. Mécanismes de régulations par SCF et APC/C durant la mitose. A : Début de la mitose et B : Fin de la mitose. Adaptée de (37).

Malgré les nombreux mécanismes de contrôle de l'APC/C-Cdc20, son activité n'est pas complètement inhibée. Une fraction mineure reste active même pendant l'activation du SAC. Cette sous-population soutient l'activité de la cycline B-CDK1 au cours de la prométaphase, en ciblant p21 pour la dégradation (77). Bien que p21 soit dégradé via SCF-SKP2 à la transition G1/S, il se ré-accumule pendant G2 et interagit avec la cycline B-Cdk1 avant d'être ubiquitiné par APC/C-CDC20. Fait intéressant, APC/C-CDC20 et APC/C-CDH1 ont des effets opposés sur les niveaux de p21. Alors que p21 est dégradé via APC/C-CDC20 tôt au cours de la mitose, APC/C-CDH1 stabilise indirectement p21 en phase G1 en ciblant SKP2 et CDC20 pour la dégradation (78, 79). De plus, APC/C-Cdc20 cible deux autres substrats pour la dégradation en début de mitose, la cycline A et NEK2A, même lorsque le point de contrôle du fuseau est actif (80, 81).

Après la stabilisation de tous les microtubules du fuseau aux kinétochores chromosomiques, le SAC est rapidement inactivé et APC/C-CDC20 est désinhibé. La compréhension de l'inactivation du SAC est encore compliquée par le fait que la protéolyse de CDC20 est également stimulée par MAD2 et BubR1 pour maintenir les niveaux de Cdc20 bas afin d'éviter une activation prématurée de l'APC/C et de maintenir le point de contrôle (75). Finalement, l'APC/C-CDC20 activé initie l'anaphase en ciblant Sécurine pour la dégradation (82). Pendant la métaphase, les chromatides sœurs sont maintenues ensemble par Cohésine. Sécurine est un chaperon qui se lie et inhibe Séparase, une enzyme capable de cliver Cohésine. Avec la dégradation de Sécurine, la Séparase est libérée, et la Cohésine centromérique est clivée, ce qui conduit à la ségrégation des chromatides sœurs (figure 9) (83).

Les deux cyclines mitotiques, la cycline A et la cycline B sont ciblées pour être dégradées par l'APC/C. Alors que la dégradation de la cycline A commence à la prométaphase, l'ubiquitination de la cycline B commence à la transition métaphase/anaphase, médiée d'abord par APC/C-CDC20 et plus tard par APC/C-CDH1 (84, 85). Notamment, APC/C-CDC20 a des effets différents sur l'activité de CDK1 en fonction de la phase mitotique. Bien qu'elle augmente l'activité de la cycline B-CDK1 au cours de la prométaphase par dégradation de p21, elle supprime la cycline B-CDK1 par dégradation de la cycline B dans la mitose tardive (77). L'activité cycline-CDK mitotique inhibe la séparase, de sorte que la dégradation de la cycline A et de la cycline B par APC/C-CDC20 est directement impliquée

dans la séparation des chromatides sœurs (42). De plus, la réduction significative de l'activité CDK en anaphase permet le démontage du fuseau mitotique, la décondensation chromosomique, la cytokinèse et la reconstitution de l'enveloppe nucléaire.

Tard durant la mitose, Aurora A et PLK1 sont finalement ciblés pour la dégradation par l'APC/C-CDH1 pour favoriser la sortie mitotique (50, 52). Un autre substrat important de l'APC/C dans la mitose tardive est la géminine, qui inhibe la réplication de l'ADN en empêchant la formation du complexe de pré-réplication (pré-RC) après la phase S, rendant la réplication possible au cours du cycle suivant (86).

Dans l'ensemble, l'APC/C est la ligase E3 centrale qui coordonne la progression mitotique, la sortie mitotique et l'établissement ultérieur d'un état G1. Bien que le début de l'anaphase soit induit par APC/C-CDC20, APC/C-CDC20 et APC/C-CDH1 orchestrent la sortie mitotique et APC/C-CDH1 contribue à l'établissement et au maintien de la phase G1 du cycle cellulaire suivant. Ce profil d'activation particulier est le résultat de différentes étapes de contrôle. Comme mentionné précédemment, CDH1 est maintenu inactivé via la phosphorylation par CDK pendant S, G2 et une partie de la mitose (87). La dégradation de la cycline B réduit l'activité de CDK à la transition métaphase/anaphase, de sorte que les niveaux de Cdh1 déphosphorylée augmentent. CDH1 déphosphorylée lie APC/C et régule négativement APC/C-CDC20 en ciblant CDC20 pour la dégradation (78, 79). De plus, une autoubiquitination de CDC20 en anaphase a été proposée pour contribuer davantage à l'inactivation de APC/C-CDC20 (88).

L'oscillation entre l'expression de CDC20 et CDH1 explique en partie comment l'APC/C agit sur la dégradation de ses différents substrats (figure 8). Selon leur domaine de destruction (D-box, KEN-box) et leur affinité pour CDC20 ou CDH1, les substrats de l'APC/C seront ciblés plus tôt ou plus tard pendant la mitose ou en G1 pour la dégradation protéasomique (89).

1.1.4. Régulation transcriptionnelle

Nous avons pu percevoir la complexité des réseaux de signalisation impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et ce, à un niveau post-traductionnel. Nous avons compris que ce processus inclut également la coordination temporelle entre différents programmes

transcriptionnels qui stimulent/inhibent l'expression de gènes effecteurs des différentes transitions du cycle cellulaire. L'exemple des cyclines nous a été de la plus grande clarté quant à ce point particulier. Au centre de ces programmes d'expression génique, se trouvent plusieurs familles de protéines associées au processus transcriptionnel. La famille des facteurs de transcription E2fs et la famille des suppresseurs de tumeurs pRb sont les plus connues et les plus étudiées à ce jour. D'autres acteurs transcriptionnels sont aussi reconnus comme importants dans le contrôle du cycle cellulaire comme les protéines DP, p53, MuvB et les membres de la famille Foxo (90). En effet, la compilation des études réalisées à ce jour suggèrent que la régulation transcriptionnelle du cycle cellulaire est orchestrée par une forte interaction fonctionnelle contrôlée de plusieurs familles de régulateurs transcriptionnels, entre autres E2F, pRB, FOXO, MuvB et DPs. La formation de complexes protéiques comme E2F-DP, E2F-RB ou DREAM, crée une dynamique régulatrice qui contrôle les niveaux d'expression et le devenir temporel des acteurs clé des différentes phases et transitions du cycle cellulaire (figure 10).

Dans ce qui suivra, nous nous pencherons d'une manière sommaire sur l'exemple de l'interaction pRb-E2F.

A ce jour, sept membres E2F ont été décrits (E2F 1-8) (91), et ces molécules existent sous forme d'hétérodimères jumelés à une sous-unité DP. Deux gènes DP de mammifères ont été identifiés jusqu'à présent (DP-1 et -2). Les protéines E2F et DP contiennent des domaines hautement conservés de liaison à l'ADN et de dimérisation. Ces deux partenaires activent la transcription de manière synergique, et les protéines DP semblent agir indirectement en renforçant l'activité d'E2F (90).

Les protéines de poche Rb (pocket proteins pRb Rb, p107 et p130) se lient au complexe E2F-DP et empêchent son activité transcriptionnelle d'une manière stérique, ce qui permet aux facteurs de transcription E2F d'agir en tant que répresseurs de la transcription génique. La phosphorylation du complexe E2F/pRb par les complexes cycline D-CDK4/6 dans la phase G1 du cycle conduit à la dissociation de pRb phosphorylée et E2F, suivie d'une transactivation par E2F de promoteurs de gènes nécessaires pour la progression de la phase S, par exemple la dihydrofolate reductase (DHFR), la cycline E et la cycline A (90). À l'exception d'E2F7/8, tous les membres de la famille E2F nécessitent une hétérodimérisation

avec une sous-unité DP (DP-1 ou DP-2) pour une activité complète, et présentent une forte homologie dans leurs domaines d'hétérodimérisation et de liaison à l'ADN. Les facteurs de transcription E2F sont divisés en trois groupes principaux: E2Fs 1-3 jouent un rôle dans la progression de G1 en phase S du cycle cellulaire et possèdent un site de liaison de pRb dans leur domaine de transactivation; E2F-4 et -5 se lient aux autres membres de la famille pRb, p107 ou p130- et E2F-7 et jouent un rôle dans la différenciation et la prolifération; et E2F-6 (également connu sous le nom EMA) régule la progression du cycle cellulaire via son rôle de répresseur transcriptionnel (92).

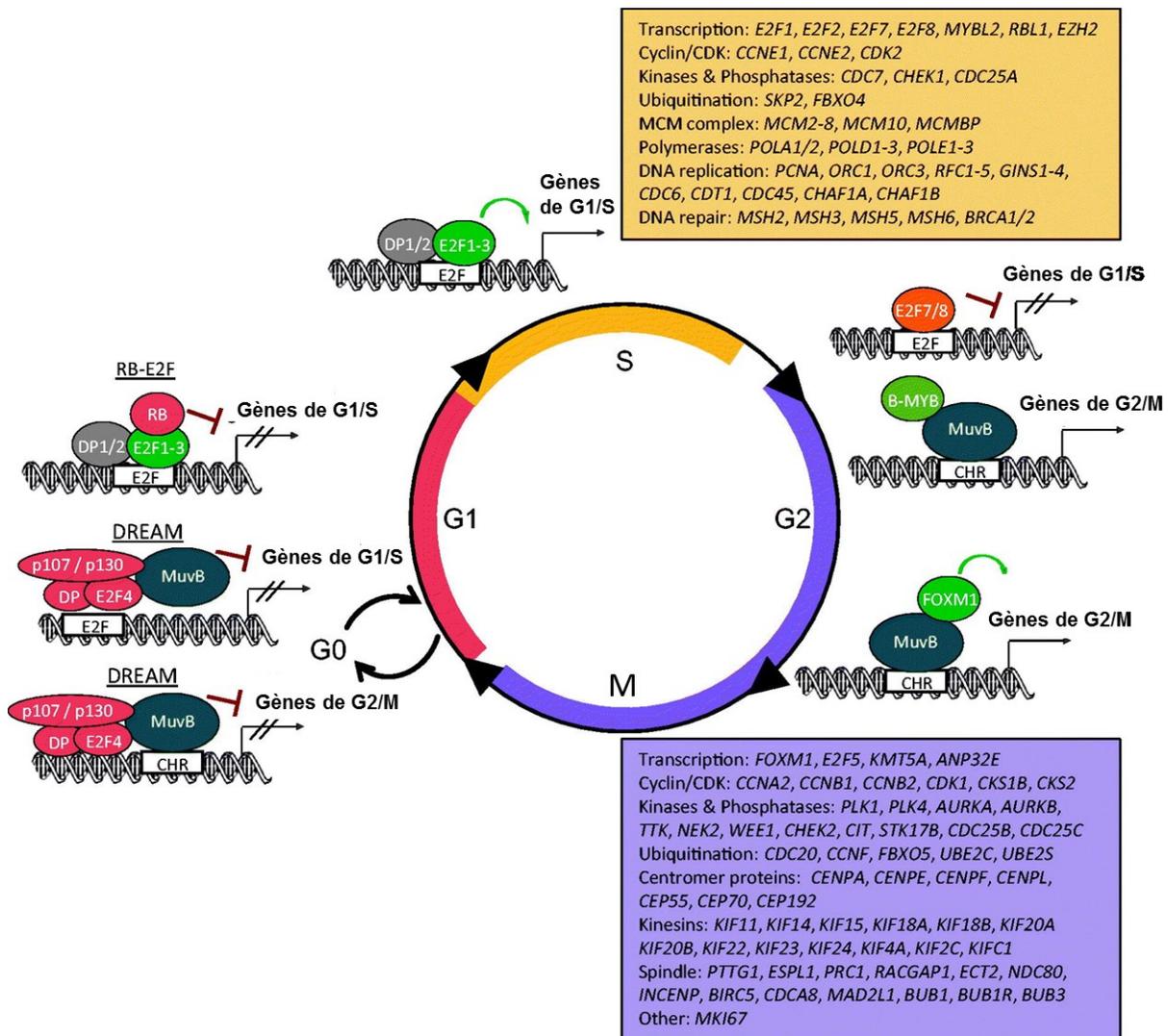


Figure 10. L'implication des facteurs E2Fs, RBs, DPs, MuvB et FOXO dans la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Adaptée de (90).

1.1.5. Régulation traductionnelle

Une bonne progression du cycle cellulaire nécessite l'expression et l'activation de protéines clés à certaines périodes de temps. Comme expliqué ci-dessus, la régulation transcriptionnelle et les modifications post-traductionnelles sont très importantes pour la progression du cycle cellulaire. Depuis un certain temps, le contrôle de l'expression des gènes au niveau de la traduction est apparu comme un mécanisme essentiel dans la régulation du cycle cellulaire. Cependant, ce mécanisme reste relativement peu étudié. Plusieurs études ont démontré que l'expression de certains des acteurs clés du cycle cellulaire tels que Cycline D, Cycline E, p27, p58, p53, CDK4, SLBP était contrôlée au niveau de la traduction (93-97).

En général, la régulation traductionnelle se produit à deux niveaux différents: le contrôle «global» dans lequel l'activité des machines de traduction est régulée, entraînant des changements dans l'efficacité de traduction de nombreux ARNm cellulaires, et un contrôle «sélectif» où la traduction de certains ARNm est réglée spécifiquement sans affecter la traduction générale.

La régulation de la traduction globale est généralement présente au niveau de l'initiation à la traduction, en affectant le niveau et l'activité des facteurs d'initiation. Lorsque les ARNm sont exportés du noyau, le complexe multi-protéique d'initiation de traduction eucaryote eIF4F s'assemble sur la structure 5'Cap-m⁷GpppN (N est tout nucléotide). Le complexe eIF4F se compose de 3 sous-unités: eIF4E (la protéine de liaison à la coiffe), eIF4A (une hélicase d'ARN) et eIF4G qui fonctionne comme une protéine d'échafaudage pouvant interagir avec eIF4E et eIF4A et plusieurs autres protéines comme PABP (poly A binding protein) et Mnk1 (la kinase de eIF4E) en même temps. Il interagit également avec la sous-unité 40S du ribosome à travers eIF3 (figure 11).

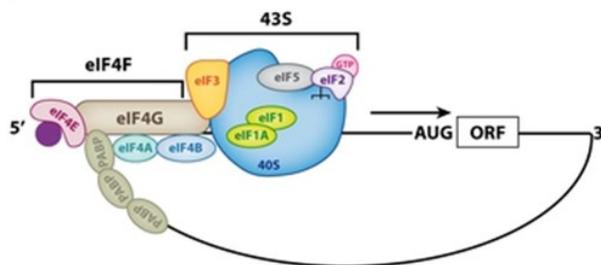


Figure 11. Initiation de la traduction dépendante de la coiffe. Adaptée de (98)

L'activité et la disponibilité de eIF4E sont réglementées comme un mécanisme important pour introduire un contrôle global sur la traduction dépendante de la coiffe, qui représente la majorité de la traduction dans la cellule. Généralement, la quantité d'eIF4E actif est inférieure au nombre d'ARNm dans la cellule, ce qui entraîne une compétition entre les ARNm pour l'eIF4E disponible. L'augmentation de la quantité d'eIF4E actif conduit ainsi à la traduction de plusieurs ARNm qui sont normalement peu compétitifs pour eIF4E. eIF4E est une phosphoprotéine et sa phosphorylation par la kinase Mnk1 améliore le taux de traduction. Il existe également une famille de protéines inhibitrices de traduction appelées protéines de liaison à eIF4E (4E-BP) dont les formes hypophosphorylées concourent avec eIF4G pour lier le même site de liaison sur eIF4E. Des quantités élevées de 4E-BP hypophosphorylée réduisent le taux de traduction dépendante de la coiffe. La phosphorylation des 4E-BP empêche leur liaison à eIF4E, ce qui augmente efficacement la concentration d'eIF4E actif, donc le taux de traduction (99).

Au cours du cycle cellulaire, la traduction est régulée au niveau global de telle sorte que le niveau de traduction soit suffisamment robuste pour permettre aux cellules de progresser à travers G1 et S, et qu'il chute en phase M (100, 101).

Dépendamment de la présence des signaux mitogènes dans le milieu, il a été démontré que les voies Ras/Raf- MAP kinase et Tor kinase sont impliquées dans la transition G1/S en affectant l'efficacité de la traduction (figure 12). La kinase mTor peut directement phosphoryler et activer la kinase ribosomique p70 S6, P70S6K, ce qui est particulièrement important pour la traduction d'une classe spéciale d'ARNm codant pour des protéines ribosomales et des facteurs d'allongement de traduction. mTor phosphoryle également 4E-BP, permettant un complexe eIF4F plus actif. En plus de mTor, la phosphorylation et l'activation de Mnk1 par les kinases MAPK est également importante pendant la progression de G1. Mnk1 est la kinase de eIF4E qui améliore également la traduction (figure 12). L'activation de ces voies permet à la cellule d'améliorer la production de ribosomes dont elle aura besoin pour sa croissance avant la division cellulaire (100, 101).

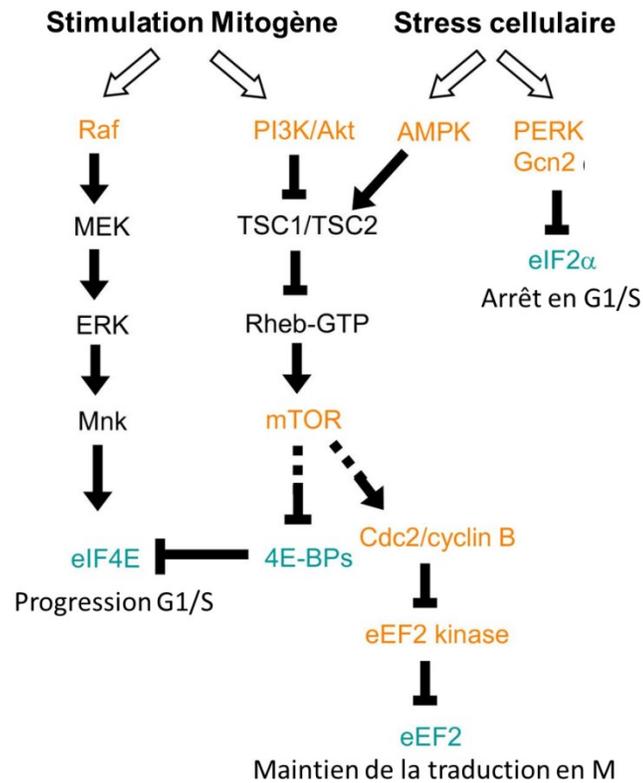


Figure 12. Lien entre les voies de signalisation et le cycle cellulaire via le contrôle traductionnel. Adaptée de (102).

Bien que la régulation de la traduction globale affecte la plupart des ARNm, elle peut avoir des effets relativement spécifiques sur la traduction de certains ARNm grâce à certains éléments *Cis*, tels qu'une structure secondaire à leur 5'UTR (103), ou un codon AUG en amont du cadre de lecture principal (figure 13).

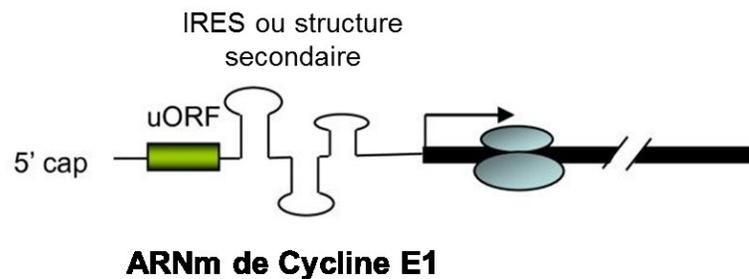


Figure 13. Les éléments en *Cis* au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm de la Cycline E1. Adaptée de (102).

Ces classes d'ARNm consistent principalement en ARNm codant pour des protéines liées à la croissance cellulaire et à la progression du cycle cellulaire. On peut citer entre autres le facteur de croissance thrombopoïétine, FGF2, Cycline D1, Cycline E1 et c-myc (104).

En mitose, 4E-BP n'est plus phosphorylée par mTOR mais par CDK1, avec un schéma de phosphorylation totalement différent. Ceci n'affecte pas l'activité traductionnelle de la cellule mais plutôt la population d'ARNm ciblée pour la traduction. En réponse au stress, 4E-BP est hypo-phosphorylée, et le niveau de traduction général diminue significativement (figure 12). Dans cette situation, un sous-ensemble d'ARNm est traduit par un mécanisme indépendant de la coiffe. Ce mécanisme implique que les ribosomes soient amenés à des ARNm entre autres par un site interne d'entrée de ribosome (IRES), sans besoin de complexe eIF4G (102).

1.1.6. Régulation post-transcriptionnelle

Nous avons jusque-ici bien mis en évidence que le contrôle de l'expression des gènes est un processus fondamental pour amener le génome à la vie et permettre à la cellule de croître et de se diviser; et qu'une mauvaise régulation est généralement associée à la maladie. Nous sommes également conscients à ce stade que l'expression des gènes est régulée à différents niveaux, et qu'il est de plus en plus évident que les divers processus impliqués dans cette régulation sont intégrés les uns aux autres.

Le contrôle transcriptionnel a reçu beaucoup d'attention, autant par des études traditionnelles sur des gènes uniques que par des approches génomiques telles que le profilage d'expression à grande échelle. Ces études ont approfondi nos connaissances sur les sites de liaison des facteurs de transcription, le remodelage de la chromatine, l'épigénétique et ont permis l'identification des différentes séquences régulatrices (105, 106). L'étude de la traduction et des différentes machineries moléculaires qui le gouvernent s'est aussi bien développée au cours des dernières décennies et les découvertes qui y sont associées sont fascinantes tant au niveau fondamental qu'à un niveau appliqué (voir section précédente). En revanche, tout ce qui a trait à ce qui se passe entre le niveau transcriptionnel et traductionnel est un domaine très fertile, où la recherche reste à développer, et un terrain peu connu, où tant de choses demandent à être découvertes.

Le contrôle post-transcriptionnel a donc été moins étudié, et cet écart est apparent lors de la recherche de ces 2 termes dans la littérature scientifique: environ 230 000 articles sont trouvés sur PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed) pour la requête de recherche "régulation transcriptionnelle", alors que la «régulation post-transcriptionnelle» ne retourne qu'environ 16000 liens. Ce fossé est partiellement dû à des raisons historiques et techniques: il est clair que la transcription est l'une des étapes fondamentales et intuitivement importantes dans la cascade de régulation de l'expression génique, et les techniques pour étudier la transcription et le contrôle transcriptionnel sont bien établies dans la communauté scientifique. Cependant, il y a eu ces dernières décennies une appréciation croissante de la nécessité et de l'importance de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle comprennent divers processus tels que la maturation de l'ARNm (polyadénylation, coiffage et épissage), l'export nucléaire et la localisation cytoplasmique, la dégradation et la régulation pré-traductionnelle. En dépit de cette variété de mécanismes de régulation, il y a une chose en commun pour chacun d'eux: ils contrôlent finalement quand et où un ARNm donné sera traduit en protéine. En conséquence, la traduction et le contrôle de la traduction font aussi partie de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

1.1.6.1. Maturation des ARN

Avant qu'un ARNm ne puisse être transporté hors du noyau dans le cytoplasme pour être disponible pour la machine de traduction, il doit subir une série d'étapes de traitement: l'ARNm acquiert une structure de coiffe à l'extrémité 5', les introns sont épissés à partir du pré-ARNm et une extrémité 3' particulière de l'ARNm est générée, habituellement par polyadénylation. Toutes ces étapes se produisent co-transcriptionnellement et peuvent s'influencer mutuellement (107). Dans ce qui suivra, un bref aperçu de ces quelques étapes importantes de la régulation post-transcriptionnelle nucléaire des ARNm sera présenté.

Ajout de la coiffe : La première étape de traitement est l'addition de la structure en coiffe, la 7-méthylguanosine, à l'extrémité 5' de l'ARNm naissant, et se produit après que 20 à 30 nucléotides ont été synthétisés (108). La coiffe est importante pour la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de sa traduction. Dans le noyau, cette structure est liée par le complexe de

liaison à la coiffe (CBC). Après son export vers le cytoplasme, elle se lie au facteur eIF4E. Cette association est une étape essentielle dans l'initiation de traduction.

Épissage : Comme les séquences codantes (exons) de la plupart des ARNm chez des eucaryotes supérieurs sont interrompues par des introns, ces introns doivent être épissés hors du pré-ARNm afin de générer un ARNm fonctionnel. L'épissage nécessite d'une part, des séquences consensuelles sur l'ARNm, qui marquent les jonctions exon-intron, et d'autre part, le spliceosome, le complexe catalytique qui effectue les réactions enzymatiques pour éliminer les introns et ligaturer les exons flanquants (109). Le spliceosome se compose de 5 petites particules de ribonucléoprotéines (snRNPs: U1, U2, U4, U5 et U6), chacune constituée d'un petit ARN nucléaire (ARNnc) et de protéines associées, ainsi que de nombreuses protéines accessoires. En fait, plus d'une centaine de protéines sont considérées comme des facteurs d'épissage. La catalyse de la réaction d'épissage elle-même dépend des interactions protéine-ARN, ARN-ARN et protéine-protéine. En outre, l'utilisation alternative des exons (épissage alternatif) peut contribuer à la création d'une variété d'ARNm, et donc de protéines, permettant ainsi à un gène de produire des isoformes multiples (109).

Polyadénylation de l'extrémité 3' : La plupart des ARNm portent également une structure spécifique sous la forme d'une queue poly (A) à leur extrémité 3'. Les seuls ARNm codants connus et dépourvus de queue poly (A) sont des ARNm d'histones et ce, dans la plupart des eucaryotes supérieurs. La polyadénylation est réalisée en deux étapes: l'ARNm naissant est clivé au niveau du site où la polyadénylation est censée commencer, s'en suit alors la synthèse de poly (A) (107). Par analogie avec l'épissage, la formation de la queue poly (A) nécessite un complexe multi-protéique de polyadénylation ainsi que des éléments de séquence spécifiques sur le pré-ARNm. La queue poly (A) émergente s'associe à la protéine de liaison au poly (A) (PABP). On pense que PABP influe positivement la longueur finale de la queue poly (A), d'une part en stimulant l'activité de la poly (A)-polymérase PAP, d'autre part de manière négative, en interagissant avec la nucléase poly (A) PAN (110). En outre, PABP est impliquée dans l'export nucléaire de l'ARNm et s'avère aussi bien importante pour le lancement de la traduction. La queue poly (A) est également cruciale pour plusieurs autres mécanismes de régulation post-transcriptionnelle dans le cytoplasme, et les polyadénylases cytoplasmiques peuvent réguler l'état de traduction et la stabilité de divers ARNm en

modifiant la longueur des queues respectives de poly (A) (111). D'un autre côté, la dégradation de l'ARNm par des mécanismes exonucléolytiques est habituellement précédée d'un raccourcissement de la queue poly (A) (112). Et il a également été démontré que la déadénylation de la queue poly est associée au processus de régulation des ARNm par les micro-ARN (miARN) (113).

1.1.6.2. L'export nucléaire

La dernière partie du voyage depuis le site de transcription vers le cytoplasme est l'export nucléaire de l'ARNm mature. L'export, grâce au complexe de pores nucléaires (NPC), se produit dans le contexte des particules ribonucléoprotéiques (mRNP) (114). Les mRNP comprennent l'ARNm, ainsi que les protéines de liaison à l'ARN associées qui se lient à l'ARNm pendant les étapes de maturation. Outre la CBC ou PABP susmentionnées, de telles protéines de liaison à l'ARN incluent des protéines SR (riche en sérine/arginine) et hnRNP (protéines RNP nucléaires hétérogènes), ou encore le complexe de jonction exon (EJC), un ensemble de protéines chargées sur l'ARNm en amont des jonctions exon-exon en conséquence de l'épissage du pré-ARNm. Ces facteurs sont importants pour l'association du mRNP au NPC et le transfert dans le cytoplasme, et certains d'entre eux restent associés à l'ARNm durant son export, alors que d'autres sont confinés au noyau. En outre, l'export nucléaire est une étape importante dans le contrôle de qualité, car les ARNm défectueux ou non traités sont non seulement inutiles, mais potentiellement nocifs s'ils sont traduits dans le cytoplasme. Seuls des ARNm fonctionnels sont exportés dans le cytoplasme et cette étape de contrôle de qualité est étroitement couplée à la maturation de l'ARN et à la composition du mRNP (114).

Même si la transcription, la maturation, l'épissage et l'export nucléaire des ARNm peuvent être décrits d'une manière indépendante, il est important de garder en tête que dans le contexte cellulaire, tous ces processus sont intégrés les uns aux autres et se déroulent d'une manière inter-dépendante au niveau spatio-temporel (115).

1.1.6.3. Dégradation de l'ARNm

La dégradation des ARNm est un concept biologique très large. Dans un sens classique, la dégradation des ARNm est l'ultime étape dans le cycle métabolique d'un ARNm,

quand la cellule a fini d'en avoir besoin. Cet aspect de la dégradation peut emprunter plusieurs voies et avoir recours à plus d'un mécanisme moléculaire, selon le contexte et l'ARNm cible. Mais ce concept de dégradation peut avoir d'autres facettes, entre autres un outil de sécurité utilisée par la machinerie de surveillance des ARNm. Contrôle de qualité, répression ou activation de la traduction, régulation du cycle de vie des ARNm, tous représentent des terrains d'influence de la dégradation des ARNm.

Voies classiques de dégradation (dépendantes de la déadénylation) : Les ARNm eucaryotes englobent deux déterminants de stabilité : - la coiffe 5' 7-méthylguanosine et - la queue 3' poly (A) - qui sont incorporés co-transcriptionnellement. Ces deux structures interagissent avec les protéines cytoplasmiques eIF4E et la protéine de liaison poly (A) (PABP), respectivement, pour protéger le transcrit des exonucléases et améliorer l'initiation de la traduction. Pour amorcer la dégradation, l'une ou l'autre de ces deux structures doit être compromise, ou l'ARNm doit être clivé intérieurement par une attaque endonucléolytique (116).

Chez les eucaryotes, la majeure partie des ARNm subit une désintégration par une voie initiée par le raccourcissement de la queue poly (A). Cette première étape de la voie de dégradation est unique dans le sens qu'elle est réversible, les transcrits ayant été ciblés par les signaux appropriés peuvent être réadénylés et retourner aux polysomes. Néanmoins, une fois que la cellule détermine qu'un ARNm doit être détruit, l'une de deux voies irréversibles est empruntée. Soit la coiffe en 5' est éliminée par un procédé appelé décoiffage (decapping), ce qui permet au corps d'ARNm d'être dégradé dans la direction 5' → 3' par l'exoribonucléase XRN1, soit l'extrémité 3' non protégée est attaquée par un grand complexe d'exonucléases 3' → 5' connu sous le nom d'exosome. Ces deux voies ne s'excluent pas mutuellement, et en plus de la forte possibilité de redondance entre ces deux mécanismes, il semble donc que la voie précise de la désintégration de l'ARNm puisse être flexible (116).

Bien que la plupart des transcrits subissent une dégradation dépendante de la déadénylation comme décrit ci-dessus, il existe plusieurs exceptions. Les ARNm spécifiques semblent contourner les voies standards pour permettre une régulation unique de dégradation.

Décapage indépendant de la déadénylation : Deux transcrits non apparentés, les ARNm de RPS28B et d'EDC1, contournent l'étape de déadénylation pour être décoiffés directement. L'ARNm de RPS28B de *S. cerevisiae* subit une désintégration par un mécanisme autorégulateur intrigant. La protéine Rps28B se lie directement à une structure tige-boucle dans le 3'UTR de son propre ARNm et recrute Edc3, un amplificateur de décoiffage. Ceci conduit vraisemblablement à l'association d'autres facteurs de décoiffage et permet un décoiffage indépendant de la déadénylation du transcrit. L'ARNm EDC1 de *S. cerevisiae*, qui code pour la protéine régulatrice de décoiffage Edc1, se dégrade également indépendamment de la déadénylation. Dans ce cas, la déadénylation semble être empêchée par une interaction entre la queue poly (A) et un prolongement poly (U) dans le 3'UTR. Ce couplage intramoléculaire bloque l'accès à la deadénylase. Que Edc1 code pour un régulateur de décoiffage et est dégradé par un chemin qui est très sensible au décoiffage indique l'existence possible d'une boucle de régulation. En outre, le décoiffage de l'ARNm de l'EDC1 nécessite certaines sous-unités du complexe CCR4-NOT, ce qui signifie un lien intéressant entre le complexe de déadénylation et le décoiffage (116).

Décomposition endoribonucléolytique : Le moyen le plus efficace de détruire un ARNm est peut-être le clivage endonucléolytique, qui produit deux fragments sensibles aux exonucléases. Plusieurs endonucléases cellulaires qui ciblent l'ARNm ont été caractérisées ces dernières années, y compris PMR1, IRE1 et, de façon quelque peu inattendue, l'enzyme de traitement de l'ARN ribosomique (ARNr) essentiellement nucléolaire, la RNase MRP. En outre, des endonucléases non identifiées ont été impliquées dans la désintégration d'ARNm aberrants, et les courts ARN interférents (siARN) initient la désintégration de l'ARNm par clivage endonucléolytique médié par la protéine Argonaute 2 (AGO2).

Contrairement à la plupart de la désintégration de l'ARNm, le clivage endonucléolytique par PMR1 se produit sur les polysomes, ciblant activement la traduction des ARNm. IRE1 est une autre endonucléase qui cible la traduction active des ARNm. Dans ce cas, les transcrits qui sont habituellement ciblés sur le réticulum endoplasmique (ER) sont rapidement clivés comme faisant partie de la réponse au dépliement de la protéine, induite suite au stress ER (116).

La RNase MRP est un complexe hétérogène avec un noyau d'ARN qui est connu pour être impliqué dans le traitement des ARNr et des ARN mitochondriaux. Cependant, des études récentes chez *S. cerevisiae* ont identifié un nouveau rôle pour la RNase MRP dans la dégradation de l'ARNm de CLB2, qui code une cycline de type B, à la fin de la mitose. On a découvert que la RNase MRP clive l'ARNm de CLB2 dans son 5' UTR, conduisant à la dégradation du produit 3' par Xrn1. L'idée que MRP ait un rôle comparable dans les cellules de mammifères est aussi intéressante. En effet, certains des défauts observés dans le syndrome d'hypoplasie cartilage-cheveux, causés par des mutations dans l'ARNase MRP, sont corrélés avec des défauts de la régulation du cycle cellulaire et des niveaux très hauts de l'ARNm de Cycline B, observés chez les patients. En raison de leur puissance, les endoribonucléases cellulaires sont hautement spécifiques et/ou régulées. IRE1 et PMR1 ne sont activés que lorsque nécessaire, alors que la RNase MRP est restreinte au nucléole et aux mitochondries, sauf à la fin de la mitose lorsqu'elle est transportée vers les corps TAM67 (116).

Chaque étape de la production d'un transcrit d'ARNm mature représente un risque d'introduire des erreurs. Pour préserver la fidélité traductionnelle, la cellule a des moyens évolués pour détecter et dégrader des transcrits aberrants, ce qui la protège des produits protéiques potentiellement toxiques.

La surveillance nucléaire des ARNm : Bien que la plupart des transcrits soient destinés à la désintégration dans le cytoplasme après une vie productive, codant pour des protéines, des erreurs de transcription, de maturation ou durant l'export, entraînent fréquemment une destruction nucléaire de l'ARNm. Comme dans le cytoplasme, les voies de dégradation de l'ARNm 3' → 5' et 5' → 3' ont un rôle dans le renouvellement de l'ARNm nucléaire, bien que la voie préférée semble être déterminée par le substrat. Les transcrits qui sont limités au noyau en raison d'un défaut d'export subissent une désintégration par les deux mécanismes. En revanche, les pré-ARNm non épissés et les ARNm avec une polyadénylation défectueuse sont sujets à une désintégration plus rapide, médiée principalement par l'exosome nucléaire (116).

La surveillance cytoplasmique : Dans cette section, nous survolerons brièvement 3 mécanismes de surveillance dépendants de la traduction et qui détectent des structures aberrantes de ribonucléoprotéines (mRNP) dans le cytoplasme.

Le mécanisme de dégradation NMD (Non-sens Mediated Decay)

Le mécanisme de surveillance le plus étudié est la désintégration NMD. NMD détecte et dégrade les transcrits qui contiennent des codons de terminaison prématurés (CTP). Les CTP peuvent provenir de mutations, de déplacements de cadres de lecture, d'une maturation inefficace, d'une initiation à la traduction altérée et de 3'UTR étendus. S'ils sont traduits, ces transcrits pourraient produire des protéines tronquées avec des fonctions aberrantes. La voie NMD a été trouvée chez tous les eucaryotes, et les protéines au centre du complexe NMD, UPF1, UPF2 et UPF3, sont fortement conservées. Au-delà de cette conservation, cependant, la détection du CTP et la méthode de dégradation du transcrit semblent avoir divergé. Néanmoins, un fil commun est la reconnaissance d'une conformation mRNP aberrante.

Dans les cellules de mammifères, une caractéristique bien définie d'un transcrit aberrant est la rétention du complexe de jonction d'exon (EJC). L'EJC est la «marque» résiduelle de l'épissage, et ce complexe de protéines est déposé 20 à 24 nucléotides en amont de chaque jonction d'exon (117). Comme la plupart des introns se trouvent dans des régions codantes, les EJC sont habituellement déplacés par la traduction des ribosomes. Mais dans les ARNm qui contiennent un CTP, certains EJC restent ancrées à l'ARNm en aval du CTP, où elles sont détectées par la machine de surveillance (114).

Malgré des mécanismes alternatifs d'identification des substrats NMD selon les espèces et les substrats, toutes les voies caractérisées ont en commun l'exigence de la composante du complexe NMD, UPF1. Dans la NMD dépendante de l'EJC, le rôle d'UPF1 et des autres composantes du complexe de surveillance devient évident. Au cours d'un événement de terminaison de traduction normal, le codon d'arrêt est reconnu par les facteurs de libération de peptide eRF1 et eRF3 conduisant à l'hydrolyse d'ARN de transfert (ARNt). Lorsque la terminaison se produit à un CTP, la libération du peptide est retardée et le ribosome reste bloqué au codon d'arrêt. Cela permet la liaison de UPF1 et de la kinase SMG1 aux facteurs de libération, formant un complexe connu sous le nom de SURF, sur le ribosome bloqué (118). À ce stade, à travers la liaison à UPF2, UPF1 interagit avec l'EJC, qui se trouve à une jonction exon-exon en aval du site de terminaison. La formation de ce pont entre la SURF et l'EJC conduit à la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 et à la dissociation des facteurs

de libération (118). Enfin, SMG7, une protéine liée à 14-3-3, s'associe au complexe et déclenche la dégradation (119).

Enfin, il convient de souligner que la voie NMD n'est pas uniquement réservée à la dégradation des transcrits aberrants, mais joue un rôle important dans la régulation de l'expression normale des gènes. L'analyse par micropuces du transcriptome dans des cellules de mammifère appauvries en UPF1 a identifié de nombreux transcrits normaux régulés à la hausse, dont certains contenaient de courts ORF en amont du cadre de lecture principal, des introns au 3' UTR, des décalages de cadres de lectures ou d'autres caractéristiques qui miment un CTP.

De plus, les ARNm apparemment dépourvus d'une caractéristique ressemblant à un CTP, à savoir les ARNm d'histones (120) et l'ARNm d'ARF1 (121), se dégradent d'une manière dépendante de UPF1. De manière surprenante, dans ces cas, UPF1 est recruté au transcrit par interaction avec un facteur lié au 3' UTR, la protéine de liaison de la tige-boucle (SLBP) dans le cas des ARNm d'histone (120) et Staufen1 dans le cas de ARF1 (le mécanisme de dégradation médié par Staufen, le SMD, sera détaillé dans une section ultérieure). Aucun de ces mécanismes n'exige UPF2 ou UPF3, ce qui indique que ces voies sont distinctes de la NMD classique.

La dégradation NSD (Non-Stop Decay)

La voie NSD cible des ARNm qui n'ont pas de codon d'arrêt. De tels transcrits peuvent être générés par clivage, ou par l'absence d'un codon d'arrêt dans le cadre, ce qui provoque une traduction le long de la queue poly (A). La polyadénylation prématurée pourrait être un facteur important dans la production de substrats pour cette voie de désintégration. En plus de protéger les cellules des protéines aberrantes, NSD facilite la libération du ribosome.

La voie de dégradation No-go

Un troisième mécanisme de surveillance d'ARNm, le NGD, découvert d'abord chez la levure, empêche la séquestration des facteurs de traduction aux transcrits défectueux. La détection des ribosomes bloqués sur un ARNm entraîne une dégradation endonucléolytique de l'ARNm près du site de décrochage. Cela libère les fragments bloqués de ribosome et d'ARNm, qui sont décomposés par l'exosome. En plus de la levure, le NGD a été détecté dans

les cellules de drosophile S2 (122), mais on sait peu de choses sur la voie NGD chez les métazoaires.

1.2. Protéines liant l'ARN, régulateurs post-transcriptionnels et cycle cellulaire

Ne nous laçons jamais d'insister sur le fait que le cycle de croissance cellulaire soit initié et maintenu par des événements régulateurs ponctuels, impliquant des modifications des protéines du cycle cellulaire, ainsi qu'une expression génique coordonnée pour prendre en charge les décisions cycliques de contrôle. Durant ces dernières décennies, les études se sont succédées qui montrent que le regroupement post-transcriptionnel de sous-ensembles d'ARN messagers par des protéines de liaison à l'ARN aide à localiser physiquement, à coordonner temporairement et à traduire efficacement les protéines du cycle cellulaire. Cette organisation dynamique des ARNm, codant pour les composants du cycle cellulaire, contribue à un gain en efficacité, en temps et en énergie dans le contrôle de la prolifération. Les découvertes qui appuient ce type d'organisation se trouvent compatibles avec le modèle de régulateurs post-transcriptionnels de l'expression génique, de plus en plus mis en évidence. Nous décrivons brièvement dans ce qui suit quelques exemples de régulateurs post-transcriptionnels du cycle cellulaire, et nous mettrons en évidence comment les défauts éventuels dans ces régulateurs peuvent conduire à un état de croissance pathologique, en l'occurrence la carcinogenèse.

Les régulateurs post-transcriptionnels d'ARN sont constitués de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui régulent de façon coordonnée la production de protéines fonctionnellement apparentées (115). Le rôle fonctionnel primaire des régulateurs d'ARN est de répondre efficacement et économiquement aux signaux cellulaires endogènes et exogènes afin d'aider à réguler des composants de voies biochimiques ou de complexes protéiques macromoléculaires : par exemple, des sous-unités de pompes cellulaires, d'organites ou d'autres machines qui fonctionnent ensemble dans des emplacements cellulaires. Les régulateurs d'ARN constitués d'ARN et de protéines de liaison à l'ARN ont été largement documentés pour coordonner les processus post-transcriptionnels chez de nombreuses espèces.

Le concept des opérons et des régulons d'ARN post-transcriptionnels, généralement appelés PTRO ou régulons d'ARN, invoque les opérons bactériens classiques découverts par Jacob et Monod (123). Ces appellations ne sont en fait qu'un outil didactique pour le rendre facilement compréhensible. Cependant, il existe des différences significatives entre les opérons classiques de bactéries et les régulons d'ARN. Ces différences ne concernent pas la dualité procaryote vs eucaryote. Elles sont dues plutôt aux divergences fondamentales entre l'organisation de l'ADN et de l'ARN dans la cellule. Bien que les gènes, au sein des opérons bactériens soient contraints par l'architecture, et ceux chez les eucaryotes, par la structure de la chromatine et l'emplacement physique dans le noyau, les ARN sont divers en quantité et en localisation, ce qui leur confère des interactions combinatoires multiples et une régulation dynamique. Cette variabilité dans la quantité et la localisation des ARN donne aux régulons post-transcriptionnels d'ARN de nombreuses propriétés supplémentaires. Tout d'abord, des copies multiples de chaque ARNm sont capables de joindre, simultanément, de nombreux régulons d'ARN différents, sur la base d'éléments de reconnaissance dans l'ARN (RRE). Deuxièmement, les régulons d'ARN sont basés sur des interactions réversibles entre les protéines de liaison à l'ARN (RBP) et les ARN. En fait, contrairement à l'ADN, les ARN sont des molécules renouvelables pour ne pas dire « jetables ». Par conséquent, les régulons d'ARN sont très dynamiques et les RNP peuvent être remodelés rapidement, car les ARN eux-mêmes sont combinatoires. Troisièmement, les régulons d'ARN offrent la propriété d'une régulation dynamique localisée. Ceci est particulièrement important chez les eucaryotes, puisque la compartimentation cellulaire nécessite un meilleur contrôle de la localisation entre les différents organites. En somme, de multiples copies de chaque ARNm peuvent utiliser leurs multiples éléments de reconnaissance ou RRE pour rejoindre d'autres groupes d'ARNm fonctionnellement liés dans le temps et dans l'espace afin d'effectuer des fonctions multiples en combinaison.

On a précédemment supposé que chaque espèce d'ARNm fonctionnait indépendamment dans la cellule eucaryote et était régulée indépendamment par des RBP distinctes. Cependant, comme on l'a noté plus haut, nous comprenons maintenant que, à quelques exceptions près, chaque ARNm pourrait être membre d'un ou de plusieurs régulons d'ARN, et la plupart des RBP régulent un grand nombre d'ARNm (124, 125).

Les premières études indiquant que les RBP pouvaient cibler de multiples ARNm régulateurs de croissance utilisaient des méthodes de liaison d'ARN *in vitro* et des procédures SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel), avec des ARN aléatoires ou des ARN extraits du cerveau humain (126) . La première preuve *in vivo* indiquant une coordination globale par des régulons d'ARN endogènes a été obtenue en développant l'immunoprécipitation d'ARN (RIP) suivie d'une procédure de micropuces, avec des protéines ELAV/Hu neuronales de mammifères, connues pour être impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaires (127). Cette étude a utilisé à la fois des puces d'ADN et des essais multicanaux de protection contre la RNase pour vérifier les ARNm codant pour les facteurs du cycle cellulaire parmi les ARNm cibles de ELAV/HuB et HuR. On peut y recenser n-myc, l-myc, b- myc, max et les Cyclines A2, B1, B2, C, D1 et D2 (127). Ces résultats étaient cohérents avec les résultats de Gorospe et ses collègues qui montraient que les ARNm de cycline A et B étaient liés et stabilisés par HuR lors de la prolifération cellulaire (128).

L'utilisation d'approches post-transcriptionnelles globales telles que RIP-chip/seq (127, 129), la dégradation temporelle de l'ARN, le profilage des polysomes et la synchronisation cellulaire ont été utilisés pour identifier les régulateurs de l'ARN impliqués dans les processus cellulaires et de développement (130). On a montré que les régulons d'ARN coordonnent les processus cellulaires comme l'homéostasie, les événements réplcatifs normaux tels que le cycle cellulaire, ainsi que les programmes de développement, les réponses aux activations biologiques ou les perturbations environnementales. Grâce à ces techniques, de nombreux exemples de régulons ARN ont émergé au cours de la dernière décennie à presque toutes les étapes de traitement post-transcriptionnel des ARN, y compris l'épissage, l'export, la traduction, la stabilité et la localisation (130).

De nombreux exemples publiés d'événements d'épissage fonctionnant comme régulons d'ARN ont suggéré que des sous-ensembles d'ARNm sont conjointement épissés. Ces transcrits se trouvent associés à des complexes RBP, tels que le complexe de jonction-exon, et éventuellement exportés vers le cytoplasme (131). Plusieurs études ont montré l'association des protéines d'export aux sous-ensembles d'ARNm dans des organismes allant de la levure

aux mammifères, dont certains incluent des ARNm codant pour le cycle cellulaire et des facteurs de prolifération (132).

1.2.1. Exemples de régulons post-transcriptionnels du cycle cellulaire

1.2.1.1. L'exemple du régulon eIF4E

Il a été montré que des composants des pores nucléaires spécifiques dans des cellules de mammifère sont importants pour l'export de sous-ensembles d'ARNm codant pour des protéines régulant la croissance cellulaire, les dommages à l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, la protéine de fixation à la coiffe, eIF4E, est un régulateur majeur de la synthèse des protéines, et possède des propriétés mitogènes et oncogènes bien documentées (133). La surexpression de eIF4E augmente l'activation de Ras, et cette dernière peut être inversée par l'expression de la protéine activatrice de GTPase (134). Plus récemment, Borden et ses collègues ont rapporté que eIF4E s'associe au noyau avec des RNP qui interviennent dans l'export nucléaire de sous-ensembles d'ARNm comme un régulon d'ARN via un mécanisme dépendant de CRM1 (135). Les cibles d'ARNm de ce régulon d'export d'ARN ont été identifiées par immunoprécipitation de type RIP-chip/seq et comprenaient plusieurs cyclines, mdm2, c-myc et d'autres facteurs liés au cycle cellulaire. On a constaté que ces ARNm possédaient un RRE à tige-boucle spécifique qu'ils ont appelé "4E-SE" fonctionnant comme un élément USER (« Untranslated Sequence Elements for Regulation »). Les auteurs ont examiné les caractéristiques structurales 3D de la tige-boucle et ont confirmé sa structure en utilisant des sondes de nucléases. Ils ont également démontré que le 4E-SE était nécessaire pour former des complexes RNP stables en utilisant la cycline D1 comme modèle. Ils ont conclu que eIF4E, agissant comme un régulon d'ARN, pourrait moduler l'expression coordonnée de ces protéines de cycle cellulaire efficacement, ce qui a un impact sur la prolifération et la survie des cellules (136).

1.2.1.2. L'exemple du régulon Nup96

Une étude dans les laboratoires de Blobel et Matunis a révélé qu'un ADNc polycistronique code pour un précurseur contenant à la fois les nucléoporines Nup98 et Nup96 (137). Une analyse plus poussée a indiqué que ce précurseur est clivé par une protéase pour

donner ces deux nucléoporines à qui on a associé plus tard des rôles fonctionnels apparentés dans le transport nucléocytoplasmique. Fait intéressant, les deux protéines ont des rôles dans le cycle cellulaire, les voies p53 et la carcinogenèse dans de nombreuses espèces (138, 139).

Nup98 peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et semble interagir directement avec la chromatine pour affecter la transcription des gènes du cycle cellulaire chez la Drosophile. Dans tous les cas, on suggère que Nup96 et Nup98 fonctionnent dans le contexte de régulateurs d'ARN post-transcriptionnels coordonnant le transport d'ARNm impliqués dans le cycle cellulaire, le développement et l'oncogenèse (138, 140).

Nup96 a plusieurs fonctions importantes et est une composante du complexe Nup107-160, un régulateur bien connu du cycle cellulaire. Dans certains cas, les composantes du complexe ont différentes stœchiométries aux pores nucléaires selon les stades du cycle cellulaire (141). Dans le cas de la mitose, la sous-unité Nup96 est régulée négativement de façon préférentielle pour que les cellules T sortent de la phase G1/S du cycle cellulaire. Dans les cellules T de souris mutantes hétérozygotes qui expriment des niveaux abaissés de Nup96, la prolifération est considérablement stimulée. Cette prolifération accrue se trouve corrélée avec un échec dans l'export de plusieurs ARNm codant pour des régulateurs du cycle cellulaire. Ce dysfonctionnement se trouve entre autres associé à l'accumulation des ARNm de la cycline D3, CDK6 et I κ B α dans le cytoplasme, tandis que le ratio nucléaire/cytoplasmique de GAPDH, ICAM-1 et α -tubuline ne change pas lorsque les niveaux de Nup96 sont abaissés (139). La prédominance cytoplasmique des ARNm de la cycline D3 et de la CDK6 a entraîné une production accrue de leurs protéines et une activation prématurée de la phase S.

1.2.1.3. L'exemple de Nup98

Nup98 est un autre exemple intéressant d'un régulateur d'export d'ARN potentiel qui est impliqué dans le cycle cellulaire et la régulation de p53 dans des cellules de mammifères. Singer et ses collègues ont indiqué que Nup98 est nécessaire pour l'expression de la protéine p21 (CDKN1A) au niveau post-transcriptionnel, et affecte ainsi plusieurs protéines dans la voie p53 (142). Suite à un essai de criblage par ARNi, Nup98 semblait être impliqué dans le ciblage de gènes régulés par p53. Des études antérieures avaient montré un lien entre Nup98 et la leucémie via un mécanisme encore inconnu. Cependant, il est extrêmement intéressant de

noter que Nup98 et Nup96 sont des produits d'un événement de clivage d'une protéine précurseur (discuté ci-dessus dans la section 1.2.1.2). La régulation de p21 rapportée dans le laboratoire Prives a montré que Nup98 forme un complexe RNP avec l'ARNm de p21 via son 3'UTR, et empêche sa dégradation par l'exosome. En utilisant une procédure RIP, il a été en effet montré que le 3'UTR de p21 se liait directement à Nup98 dans des cellules HepG2 et une analyse plus poussée suggère l'implication d'un RRE riche en C, également présent dans d'autres ARNm. Par exemple, leurs données basées sur l'analyse informatique indiquent que l'ARNm codant pour la protéine 14-3-3 σ , un autre facteur de la voie p53, est lié de manière similaire à Nup98 et protégé contre la dégradation. En outre, les auteurs ont confirmé, en utilisant une RIP-seq et qPCR, que la protéine 14-3-3 σ a un RRE riche en C similaire à celui impliqué dans la liaison à Nup98. Ils ont ensuite montré que Nup98 est nécessaire pour que les cellules entrent en sénescence médiée par p53 et puissent partiellement être protégées contre l'apoptose. Les niveaux d'expression de Nup98 ainsi que 14-3-3 σ ont tous les deux diminué en concert suite aux dommages à l'ADN, comme démontré en utilisant des carcinomes hépatocellulaires murins et dans une cohorte d'échantillons de patients (142). Une conclusion importante est que si Nup98 est un suppresseur de tumeur, il serait avantageux pour les cellules cancéreuses d'inactiver Nup98 pendant leur évolution, ou compromettre sa fonction par le biais de fusions au niveau du gène Nup98, comme il a été rapporté dans plusieurs études (143).

En résumé, plusieurs études suggèrent que Nup98 fonctionne comme un RBP qui se lie à un sous-ensemble de gènes cibles de p53 et régule la stabilité de leurs ARNm. Ceci est à la fois excitant et unique. C'est l'émergence d'une voie « suppresseur de tumeur » indépendante dans laquelle Nup98 peut réguler la voie p53.

1.2.1.4. SLBP : l'exemple parfait

SLBP, pour Stem-Loop Binding Protein est une RBP qui forme un complexe stable avec la structure en tige-boucle au 3'UTR du pré-ARNm des histones. Avant l'entrée en phase S, cette association va faciliter la maturation de ces pré-ARNm dans le noyau. SLBP participe également à l'export nucléaire des ARNm nouvellement formés. Une fois dans le cytoplasme, elle s'associe au complexe eIF4E, grâce à l'interaction avec la protéine SLIP1, afin d'activer

la traduction des histones. À la fin de la phase S, SLBP se lie au facteur UPF1 afin d'induire la dégradation des ARNm des histones, mettant fin au cycle réplcatif, en attendant l'arrivée d'un nouveau cycle. Une fois sa mission achevée, SLBP est phosphorylée par le complexe Cycline A-CDK1 (Thr61), et ciblée par le complexe SCF et dégradée par le protéasome 26S (144).

La protéine de liaison à l'ARN SLBP illustre bien 2 modèles : le premier, celui de régulon post-transcriptionnel du cycle cellulaire. En l'occurrence, une RBP qui prend en charge les pré-ARNm d'un groupe de gènes (les Histones) impliqués dans une phase du cycle cellulaire (phase S), pour contribuer à toutes les étapes de régulation post-transcriptionnelle de leur expression. On cite la maturation au noyau, l'export nucléaire et le transport cytoplasmique, le recrutement aux polysomes et l'activation traductionnelle, de même que le recrutement du complexe UPF1 et la dégradation. Le deuxième modèle est celui qui stipule que les effecteurs du cycle cellulaire sont régulés eux-mêmes lors des différentes transitions, entre autres par les complexes CDK (phosphorylation) et SCF ou APC/C (ubiquitination et protéolyse) (figure 14).

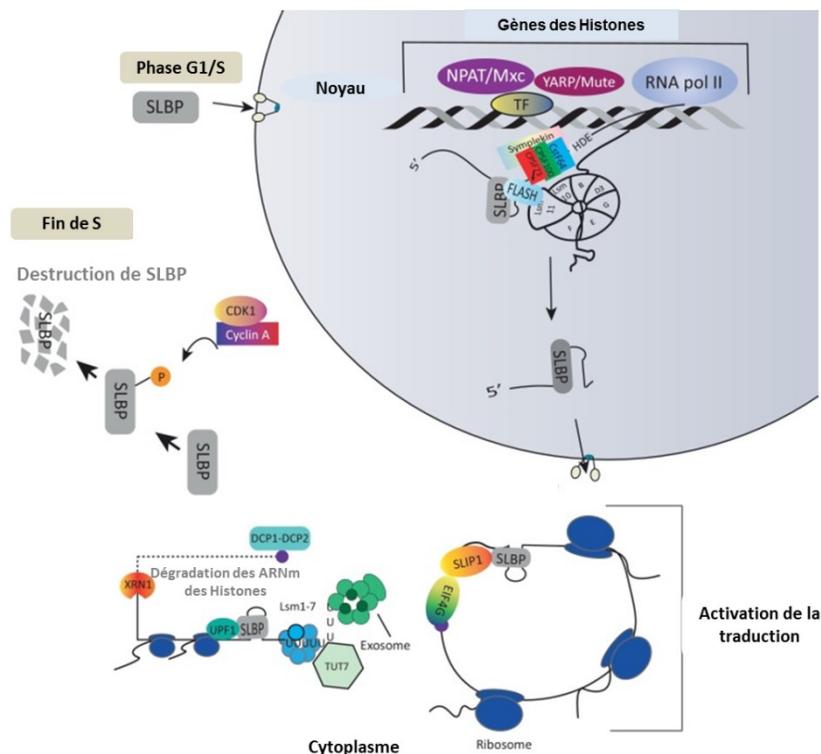


Figure 14. Schéma illustrant le cycle de vie des ARNm des Histones et de la protéine SLBP. Adaptée de (144).

1.2.2. Régulons d'ARN et points de contrôle du cycle cellulaire

Parmi les événements mutationnels les plus répandus dans le cancer, on trouve ceux touchant la kinase du point de contrôle Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM). La réponse ATM est activée lorsque l'ADN subit des ruptures double brin par irradiation, un stress oxydatif ou d'autres formes d'agression physique ou chimique. L'activation de la kinase provoque la phosphorylation d'une série de régulateurs de points de contrôle du cycle cellulaire, y compris la kinase du point de contrôle 2 (CHK2) et d'autres protéines dans la voie p53 impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et à la réparation. Cette réponse contribue à minimiser les effets des lésions de l'ADN en retardant le cycle cellulaire ou en induisant l'apoptose pour éliminer les cellules endommagées. Plusieurs RBP, y compris HuR, TIAR, PSF, Nucléoline et autres répondent au stress induit et aux dommages à l'ADN (145). Avec le temps, une nouvelle classe de RBP répondant aux dommages à l'ADN a été baptisée DDRBP (DNA Damage Response RBP) (146). Dans certains cas, ces RBP s'en trouvent relocalisées aux granules de stress. On pense que le rôle des granules de stress résultant du stress oxydatif sert au stockage temporaire des RBP et de leur cargaison d'ARN afin de protéger les ARNm jusqu'à ce que l'ADN soit réparé. La mutation de certaines RBP peut conduire à une transition des granules de stress dynamiques à des granules de stress pathologique, ce qui constitue un événement majeur dans les maladies neurodégénératives. Dans le cas de l'exposition des cellules aux UVC, il a été montré que les niveaux d'ARNm de p53 ne changent pas, alors que sa traduction en protéine est stimulée. On a également montré que la production accrue de p53 dans ces conditions impliquait que HuR agisse sur le 3'UTR de l'ARNm de p53. Ces résultats ont été confirmés en utilisant l'interférence d'ARN contre HuR pour démontrer l'inhibition attendue de la production de p53. Il est logique de s'attendre à ce que, lorsque la synthèse de la protéine p53 est altérée, les cibles de transcription en aval de p53 soient affectées en conséquence.

Gartenhaus et ses collègues ont profité de ces observations pour examiner si HuR participe à la réponse ATM à un niveau global via les régulons d'ARN (147). Il a été montré que la kinase CHK2 phosphoryle HuR aux résidus 88, 100 et 118 et altère ainsi sa spécificité de liaison à l'ARNm de SIRT1 après induction du stress oxydatif. Un modèle précédent a été proposé par le laboratoire Gorospe illustrant qu'ATM et CHK2 coopèrent pour réguler la

liaison de sous-ensembles d'ARNm spécifiques par HuR (148). Gartenhaus et ses collaborateurs ont conclu que des réseaux modulaires de cibles contrôlées par HuR codant pour des protéines fonctionnelles de la voie p53 et d'autres voies de croissance sont coordonnés globalement dans les réponses aux lésions de l'ADN (147). Par exemple, cette étude a identifié de nombreuses cibles d'ARNm de HuR qui codent pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, les points de contrôle, la régulation de MAP kinase et les réponses au stress. Parmi ceux-ci, il y avait p21, FOXO3, MEK1, MEK2 et DUSP10. La liaison aux ARNm codants pour ces protéines a été directement étudiée en utilisant des mutants HuR aux sites de phosphorylation de CHK2 (S88A, S100A et T118A) dans le contexte d'une stimulation de la signalisation ATM/CHK2. Les auteurs ont aussi testé l'effet des inhibiteurs de CHK2 sur le fonctionnement de la voie HuR en présence ou en absence d'irradiation. Globalement, la cascade ATM/CHK2 affecte l'état de phosphorylation de HuR, qui cible ensuite des sous-populations d'ARNm fonctionnellement apparentées codant des facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire et la régulation du cycle cellulaire.

En résumé, ces études globales de ciblage d'ARNm avec des protéines ELAV/Hu ont systématiquement identifié bon nombre des cibles communes d'ARNm codant pour la prolifération cellulaire et les protéines du cycle cellulaire, appuyant le modèle de régulateurs d'ARN.

Le modèle qui s'est construit autour de la régulation post-transcriptionnelle et de son rôle dans le contrôle spatio-temporel coordonné de plusieurs processus cellulaires se consolide de jour en jour avec les découvertes de plus en plus fréquentes de protéines liant l'ARN et de microARN se trouvant au centre de ce modèle.

Staufen, une protéine liant l'ARN, fait partie de ces incroyables découvertes qui ont contribué à révolutionner notre approche de la régulation de l'expression génique et qui ont aidé à approfondir notre compréhension des mécanismes régissant divers processus cellulaires et physiologiques. La section qui suit va porter un regard attentif à tout ce qui a trait à Staufen, sa découverte, sa structure, ses multiples fonctions, ainsi que les éléments qui nous ont conduit à sonder son implication dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire.

1.3. Staufen1 un acteur majeur de la régulation post-transcriptionnelle

1.3.1. Présentation générale

Staufen appartient à la famille des protéines de liaison à l'ARN double brin (dsRNA). Elle a été décrite initialement chez *Drosophila melanogaster* pour son implication dans le transport de l'ARN maternel pendant l'embryogenèse (149). Staufen a été initialement identifiée comme un facteur impliqué dans la localisation de deux ARN maternels, l'ARNm *bicoïd* et l'ARNm *oskar* dans l'embryon de la drosophile, et se trouve donc nécessaire à la formation de l'axe antéro-postérieur (150). Staufen de *Drosophila melanogaster* (dmStau) contient cinq domaines de liaison au dsRNA : les dsRBD. Au cours de l'oogenèse, dmStau co-localise avec l'ARNm *oskar* et est responsable de sa localisation postérieure. D'autre part, dmStau est nécessaire pour que l'ARNm *bicoïd* soit ancré au pôle antérieur des œufs fécondés. La localisation antérieure de l'ARNm *bicoïd* dépend de la structure tige-boucle dans le 3'UTR, qui se lie spécifiquement à dmStau (149). Par ailleurs, deux protéines codées par des gènes distincts, Staufen1 (STAU1) et Staufen2 (STAU2), ont été identifiées comme homologues de Staufen chez les mammifères (151, 152).

1.3.2. Un bref historique de l'appellation de Staufen

Les 2 paralogues humains de Staufen (STAU1 et STAU2) ont donc été nommés d'après leur orthologue chez la drosophile, qui a été défini comme un locus maternel suite à un criblage génétique entrepris par Trudi Schupbach et Eric Wieschaus (153). Bien que Staufen dérive d'un gène strictement maternel qui s'exprime à des niveaux élevés dans la lignée germinale femelle adulte, et en particulier au niveau du système nerveux central embryonnaire, il n'est pas nécessaire pour la survie de la mère. Les homozygotes n'exprimant pas Staufen sont fertiles mais donnent naissance à des embryons défectueux qui ne localisent pas correctement les ARNm qui lient Staufen au cours de l'oogenèse (154). Ceci nous ramène à l'anecdote historique qui a contribué à baptiser cette protéine :

Il y avait deux familles nobles allemandes nommées Staufen. L'une vivait dans la région de Fribourg, autour de laquelle il y a encore une ville sous le nom de Staufen, mais elle

n'a rien à voir avec l'appellation de Staufen. La deuxième famille était encore plus noble que la première, plus souvent appelée «Hohenstaufen» (Staufen de haut rang), vivant au niveau du château Hohenstaufen situé près de la ville de Göppingen, à l'est de Stuttgart. Il y a eu trois empereurs allemands de cette famille. Le premier fut Friedrich I. Von Hohenstaufen, également connu sous le nom de Barberousse. Il fut élu roi d'Allemagne en 1152, couronné empereur du «Saint Empire romain germanique de la nation allemande» en 1155 et mourut en 1190. Le second fut le fils de Friedrich, Heinrich IV, qui fut nommé roi d'Allemagne en 1169 à l'âge de quatre ans et est devenu empereur après la mort de son père en 1191. Heinrich est mort en 1197. Le fils de Heinrich, Philipp Von Schwaben était roi d'Allemagne de 1198 à 1208, mais n'a jamais été couronné empereur. Le dernier empereur fut Friedrich II. Il est né en 1194, élu roi en 1211 et couronné empereur en 1220. Cet empereur est mort en 1250, et avec lui toute sa descendance mâle, mettant ainsi fin à la famille Staufen et à son règne sur l'empire romain germanique (155). Comme la conséquence du défaut de son expression chez la descendance de la drosophile, qui meurt avant d'atteindre le stade adulte, Staufen a été « un nom maudit » pour cette famille d'empereurs dont la chaîne de descendance a été définitivement rompue.

1.3.3. Staufen est une protéine conservée

La forme humaine STAU a une ressemblance structurelle et fonctionnelle importante avec celle de la drosophile, dStau. En fait, elle comporte quatre dsRBD qui sont analogues aux dsRBD 2 à 5 de dStau (156). La capacité de liaison des dsRBD de STAU1 ou STAU2 à l'ARN double brin a été étudiée en utilisant le 3'UTR de *bicoid* comme sonde. Les résultats indiquent que le dsRBD3 est le déterminant important de la liaison au dsRNA (156, 157). De plus, l'inhibition de l'expression de Staufen dans les embryons de poisson zèbre peut être compensée par l'injection de l'ARNm de dStau, indiquant une fonction fortement conservée pour cette protéine chez les vertébrés et les insectes (158).

1.3.4. Structure de Staufen

STAU1, comme son paralogue STAU2, contient quatre dsRBD (figure 15) et un domaine TBD. Le gène *STAU1* code pour au moins deux isoformes (63 et 55 kDa), alors que le gène *STAU2* code pour au moins quatre isoformes (62, 59, 56 et 52 kDa). Tous les

isoformes sont générés par épissage alternatif et/ou polyadénylation du pré-ARNm. STAU2 et STAU1 sont similaires à environ 50%, et les domaines fonctionnels de liaison à l'ARN dsRBD 3 et 4 sont similaires à 78% et 81%, respectivement (151, 156, 157). Cependant, le dsRBD2 et le domaine de liaison à la tubuline (TBD) de STAU1 et de STAU2 ne sont similaires qu'à 48% et 18%, respectivement. Contrairement à STAU1, STAU2 contient le domaine dsRBD1 mais pas le domaine dsRBD5 (159). Même si dsRBD 3 et 4 sont très similaires entre STAU1 et STAU2, Furic et ses collègues ont indiqué que la teneur en ARNm des mRNP (Particules Ribonucléiques) de STAU1 et des mRNP de STAU2 est largement distincte, ne manifestant que des chevauchements d'environ 30% (160).

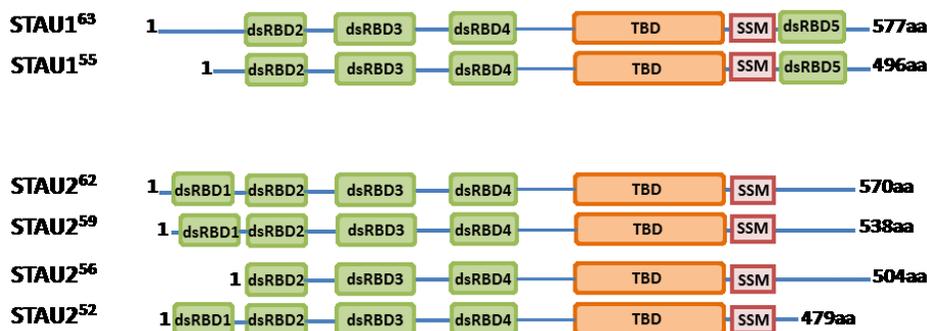


Figure 15. Représentation schématique des domaines fonctionnels et structuraux des différents isoformes de STAU1 et STAU2.

De plus, le rapport relatif de l'abondance de STAU1 et de STAU2 varie entre les tissus et les cellules. Par exemple STAU2 est enrichi dans le cerveau et le cœur, alors que l'expression de Stau1 semble ubiquitaire (157, 161). Ces différences peuvent expliquer comment les deux paralogues peuvent avoir des rôles cellulaires distincts.

1.3.5. Localisation cellulaire de STAU1

Au niveau cellulaire, STAU1 est principalement localisé dans le cytoplasme avec une distribution qui rappelle celle du réticulum endoplasmique, avec un enrichissement dans la région périnucléaire (156, 162). Bien que STAU1 ne s'y accumule pas, il est accepté que STAU1 se retrouve également dans le noyau, et plus précisément au niveau nucléolaire (156, 163). Cette dernière localisation se fait grâce à un NLS (Signal de Localisation Nucléaire) fonctionnel situé dans la région C-terminale du dsRBD3, par laquelle la protéine est activement importée dans le noyau (164). La contribution d'autres facteurs ne peut cependant

être exclue. Le dsRBD3/NLS sert également de médiateur au trafic entre le noyau et le nucléole, et contribue aussi à la rétention cytoplasmique, également connue sous le nom d'activité MOI (modulation de l'import). L'activité MOI du dsRBD3 requiert la collaboration des domaines dsRBD2 et dsRBD4. Dans ce contexte, une compétition entre dsRBD2 et dsRBD4 pour réguler la fonction de dsRBD3 ne peut être exclue (164), sachant que cette interaction fonctionnelle des dsRBD a été décrite pour d'autres protéines (165).

Puisqu'aucun NES (Signal d'Export Nucléaire) n'a encore été formellement identifié, STAU1 pourrait sortir du noyau à l'aide d'autres cofacteurs exportés. En fait, il n'a jamais été montré que STAU1 est exporté par la voie dépendante de CRM1 (164), mais son export pourrait se produire grâce à son interaction avec exportin-5 via le domaine dsRBD3 ou grâce à d'autres voies possibles (165). Ce processus d'équilibre entre l'import nucléaire et l'export nucléocytoplasmique fait en sorte que STAU1 est essentiellement localisé dans le cytoplasme en dépit de son NLS (164).

1.3.6. Aperçu de l'aspect multifonctionnel de la protéine Staufen1

Comme son homologue chez la drosophile, STAU1 est impliqué dans le transport de l'ARN, phénomène largement décrit dans les neurones (166). En plus de son rôle dans le transport d'ARN, plusieurs fonctions ont été décrites pour la protéine, fonctions qui semblent parfois contradictoires. STAU1 est associé aux ribosomes, aux polysomes et au réticulum endoplasmique rugueux (162), et a également été décrit dans les complexes ribonucléoprotéiques au niveau des neurones (167). Ces résultats suggèrent une fonction pour STAU1 dans la modulation de la traduction, comme cela a été décrit en premier par Dugré-Brisson et ses collègues (168). Ceci peut être réalisé par modification de l'activité ribosomique ou grâce à l'interaction avec des protéines chaperones, qui stabilisent la protéine nouvellement formée, ce qui augmente la vitesse d'allongement de la traduction. STAU1 contribue également à la formation des ribonucléoparticules (166, 168), qui se déplacent le long du réseau de microtubules de la cellule (156, 166). Cette association aux microtubules pourraient être importants pour son activité (163), étant donné que ces complexes RNP sont impliqués dans la localisation de l'ARNm et sont continuellement modifiés par la liaison et la libération des partenaires protéiques (164). STAU1 est également associé à des granules de stress (SG), qui sont de grands agrégats de RNP dans le cytoplasme induits par le stress cellulaire et

contiennent de l'ARN silencieux pendant la durée de leur persistance. Dans certains cas STAUI peut favoriser le désassemblage des SG et régule ainsi la réponse au stress. Parallèlement, un rôle de Staufen1 dans la dégradation d'ARNm spécifiques a été largement décrit. Ce mécanisme a été baptisé Staufen-Médiated Decay (SMD) (169).

À la lumière de toutes ces données, on peut conclure que STAUI participe à la régulation de la stabilité, de la localisation et de la traduction de nombreux transcrits cellulaires.

Les sections suivantes décriront plus en détails certains des aspects fonctionnels de STAUI, tels que la régulation de l'épissage alternatif, la dégradation spécifique de l'ARN et la régulation de la traduction.

1.3.7. Implication de Stau1 dans l'épissage alternatif de pré-ARNm : Cas de la Dystrophie Myotonique de type 1

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est provoquée par une expansion des répétitions CUG situées dans la région 3'UTR de l'ARNm codant la protéine kinase de la dystrophie myotonique (DMPK). La gravité pathologique de DM1 est corrélée au nombre de répétitions CUG (170). Cette expansion provoque un gain de fonction de l'ARNm du mutant CUG^{exp}, qui s'accumule dans le noyau sous forme de foyers ribonucléaires, séquestrant et régulant de manière incorrecte des facteurs de transcription et des protéines de liaison à l'ARN normalement destinées à réguler d'autres gènes et/ou ARNm (171). Ainsi, le déséquilibre de ces régulateurs cellulaires induit un effet cellulaire toxique sur l'expression, le métabolisme et/ou l'épissage des ARNm cibles, conduisant aux phénotypes complexes observés dans la DM1 (172). En particulier, les événements aberrants d'épissage peuvent expliquer des symptômes, tels que la résistance à l'insuline et la myotonie, qui sont liés à l'épissage aberrant des pré-ARNm des récepteurs de l'insuline (INSR) et des canaux à chlorure (CIC-1) respectivement (173).

Bien que la localisation nucléaire de STAUI soit rarement observée, elle se trouve en revanche bien documentée dans le cas de la DM1. En effet, l'équipe du professeur Côté, en collaboration avec celle du professeur Jasmin, de l'université d'Ottawa, a montré une implication directe de STAUI dans la régulation de la DM1, au niveau nucléaire.

Déjà dans un article publié en 2012, ils avaient montré que l'expression de STAU1 était accentuée dans le muscle squelettique des patients DM1, ainsi que dans des modèles de souris DM1. Ils décrivaient également une récupération - dépendante de STAU1 - du profil normal d'épissage alternatif des pré-ARNm, de INSR et CLC1, connus pour être épissés d'une manière aberrante dans le cas de la DM1 (174).

En 2016, en plus d'un rôle de STAU1 dans l'inhibition de la formation des granules de stress dans les myoblastes DM1 (175), ces deux laboratoires ont dévoilé en partie, le mécanisme d'action par lequel STAU1 agit au niveau nucléaire, dans le contexte de la DM1 (176). En fait, leurs résultats suggèrent que STAU1 agit sur l'épissage alternatif de l'exon 11 de l'INSR humain, en se liant à des éléments *Alu* situés dans l'intron 10. Les séquences *Alu* étant les répétitions dispersées (ou éléments mobiles) les plus abondants du génome humain (1 090 000 séquences *Alu*), réparties dans l'ensemble des chromosomes, ce qui représente environ 10 % du génome humain. De plus, en utilisant un criblage RT-PCR à haut débit, Côté et ses collaborateurs ont identifié de nombreux événements d'épissage alternatifs (ASE) régulés par STAU1 dans les myoblastes WT (sauvages) et DM1. Un certain nombre de ces ASE aberrants dans DM1, incluant celui de l'exon 11 de l'INSR, sont inversés par la surexpression de STAU1. Cependant, d'autres ASE dans les cellules DM1 ont été identifiés, où la surexpression de STAU1 décale les schémas normaux d'épissage chez les sujets WT. Dans un cadre plus général, ce criblage a mis en évidence que tous les ASE régulés par STAU1 hébergent des éléments *Alu* dans des régions introniques flanquant l'exon alternatif en comparaison des pré-ARNm non ciblés par STAU1 (176).

En conclusion, ces données mettent en évidence un rôle majeur de STAU1 dans la régulation de l'épissage et suggèrent que STAU1 peut agir comme un régulateur de la DM1.

Récemment, plusieurs longs ARN non codants (LncRNA), ont été répertoriés dans les cas de dystrophies comme étant des régulateurs centraux, tant au niveau nucléaire que cytoplasmique (177). Il serait intéressant dans ce contexte d'approfondir l'implication de STAU1 dans le ciblage des substrats de ces LncRNA et ses conséquences moléculaires et physiologiques *in vivo*.

1.3.8. Dégradation de l'ARN médiée par Staufen ou SMD : Mécanisme et implications fonctionnelles

En 2005, Kim et ses collègues ont utilisé UPF1 humaine, un facteur central dans la voie de dégradation NMD (consulter la section 1.1.6.3), comme appât dans un essai double hybride afin d'identifier d'autres facteurs de cette voie. Après avoir corroboré que STAU1 et UPF1 interagissent directement lorsqu'elles sont synthétisées et purifiées à partir d'*Escherichia coli*, ils ont pu démontrer que les deux protéines co-immunoprécipitent, et d'une manière indépendante de l'ARN, à partir de lysats de cellules HeLa. Cela a fait germer l'hypothèse stipulant que STAU1 pourrait fonctionner de façon analogue à la façon dont un complexe exon-jonction (EJC) fonctionne pendant la NMD: il pourrait recruter UPF1 au 3'UTR de l'ARNm cible afin de déclencher sa dégradation lorsque la traduction se termine en amont de l'endroit où UPF1 a été recruté (121). Cette idée a été confirmée en amorçant l'attachement de STAU1, marquée par la protéine MS2, à un site de liaison à MS2 qui était situé en aval d'un codon de terminaison: on a montré que STAU1 attachée déclenchait la déstabilisation de l'ARNm (121). Cette réaction est inhibée par une régulation négative d'UPF1, mais pas par les autres facteurs du NMD. De plus, STAU1 a la capacité de se lier aux 3'UTR d'un ensemble d'ARNm cibles, et il en résulte pour nombre de ces cibles une diminution significative de leur durée de vie. Ce mécanisme pourrait être dépendant à la fois de la traduction et de la présence d'UPF1 (121, 169). Par ailleurs, des analyses de micropuces ont montré que d'une manière conservée, environ 1% des 11569 ARNm de cellules HeLa examinés se trouvent surexprimés quand l'expression de STAU1 est inhibée (voir la section 1.3.10), ce qui suggère que le SMD constitue une voie de régulation post-transcriptionnelle importante (169).

1.3.8.1. Sites de liaison ciblés par le SMD

STAU1 contient quatre domaines de liaison à l'ARN double brin (figure 15). dsRBD3 et dsRBD4 (mais pas dsRBD2 ou dsRBD5) sont responsables de la liaison aux dsRNA (156).

Le SMD nécessite la liaison de STAU1 à un site de liaison STAU1 (SBS) qui est situé suffisamment en aval d'un codon de terminaison dans le 3'UTR des ARNm cibles (121, 169, 178), vraisemblablement pour que le ribosome en terminaison de traduction ne se heurte pas à pas à STAU1, ce qui pourrait causer sa dissociation de la séquence cible. La SBS peut représenter un duplex intramoléculaire formant une structure à tige-boucle ou bien un duplex

intermoléculaire qui peut être formé par l'association entre un LncRNA et le 3'UTR de la séquence ciblée (178). Enfin STAU1 peut se lier à un SBS formé par des duplex ARNm-ARNm codant pour des protéines différentes, et contenant des séquences *Alu* dans leur 3'UTR, pour induire leur dégradation par SMD. Ceci a été entre autre montré pour les duplex formés par les ARNm codant pour SOWAHC et CDCP1. L'implication du SMD sur ce type de SBS intermoléculaire a été validée dans le processus de migration et d'Invasion cellulaire de l'adénocarcinome pancréatique (179).

1.3.8.2. Staufen2 : un partenaire de Staufen1 dans le SMD

Au niveau mécanistique, une contribution active de STAU2 a été suggérée, en plus du rôle central de UPF1 (180). Ces travaux publiés en 2013 proposent en effet un nouveau modèle pour le SMD qui ne veut plus dire « STAU1-Mediated Decay » mais « STAU-Mediated decay » (figure 16). Ce modèle stipule ce qui suit : STAU1 et/ ou STAU2, soit individuellement, soit plus vraisemblablement comme homo- ou hétérodimères sinon multimères, se lient à un SBS au 3'UTR, qui peut être formé par un appariement de bases intramoléculaire ou intermoléculaire. La formation des homodimères, des hétérodimères ou des multimères se fait principalement grâce au domaine SSM (STAU-Swapping Motif) et/ou le dsRBD5 (figure 15). Durant la synthèse des protéines, lorsque les ribosomes atteignent un codon de terminaison qui réside suffisamment en amont d'un SBS, de sorte que STAU1 et/ou STAU2 liés ne sont pas éliminés par le ribosome terminant, UPF1, qui est recruté par STAU (s) lié (s) à SBS, est activé pour amorcer la dégradation de l'ARN (figure 16). L'activation du SMD peut impliquer la phosphorylation de UPF1, éventuellement par SMG1 (il a été rapporté que la phosphorylation d'UPF1 améliore la co-IP de UPF1 avec STAU1 (181)). STAU favorise un changement de conformation dans UPF1, améliorant ainsi l'activité hélicase d'UPF1 sans favoriser pour autant son activité ATPase (180). Ceci étant dit, il est important de noter cependant que l'hydrolyse d'ATP est requise pour l'activité d'hélicase, elle-même requise pour le remodelage des mRNP, comme dans le cas du NMD (182).

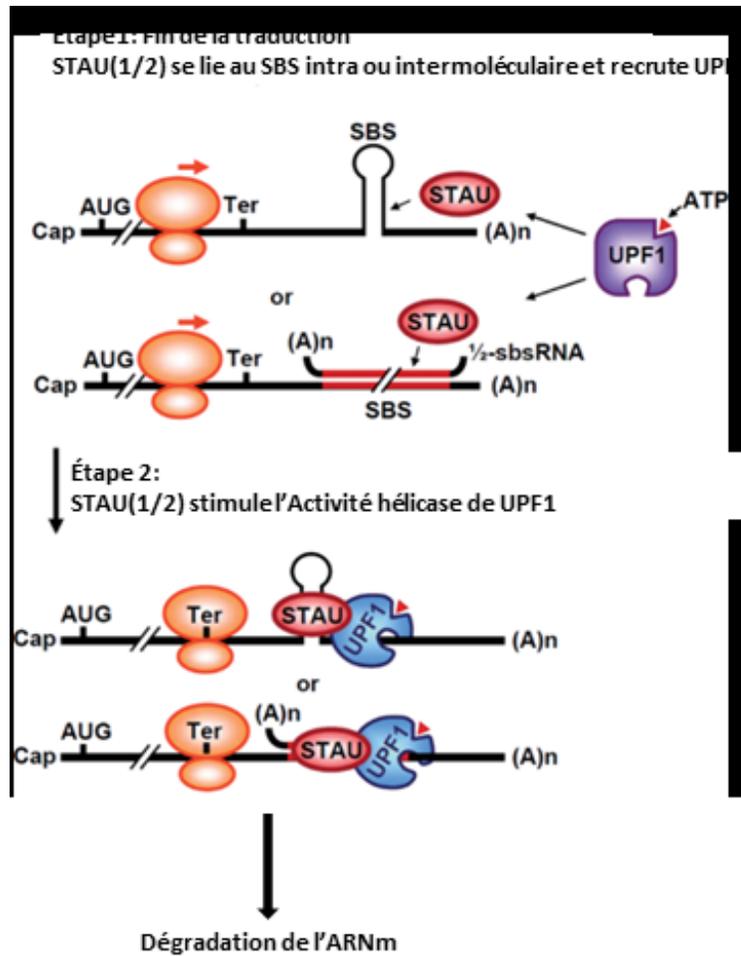


Figure 16. Modèle pour le SMD, impliquant l'hélicase UPF1. Adaptée de (183).

1.3.8.3. Relation fonctionnelle entre SMD et NMD

Étant donné qu'UPF1 joue un rôle crucial à la fois dans le SMD et le NMD, et que STAU1 et le facteur NMD, UPF2, lient des régions chevauchantes du domaine C-terminal d'UPF1, il s'ensuit que le SMD et le NMD semblent être des voies concurrentielles. Par ailleurs, certaines données viennent consolider cette idée : 1- la régulation négative de l'abondance cellulaire de STAU1 favorise la co-immunoprécipitation d'UPF2 et UPF1, et augmente l'efficacité du NMD. 2- la régulation négative d'UPF2 augmente la co-immunoprécipitation de STAU1 et UPF1, et augmente l'efficacité du SMD (184). En outre, Cho et ses collègues ont montré que la protéine régulatrice du récepteur nucléaire riche en proline (PNRC2) fonctionne à la fois dans le SMD et le NMD (181, 185). PNRC2 interagit avec UPF1 hyperphosphorylée environ cinq fois plus efficacement qu'avec UPF1 hypo

phosphorylée, la forme majoritaire d'UPF1. Ainsi, PNRC2, avec STAU1, sinon aussi STAU2 et UPF2, peut servir d'un autre rhéostat pour l'équilibre entre SMD et NMD. Dans ce qui suit une brève description de quelques-uns des rôles physiologiques du SMD, et de la potentielle inter-régulation avec les facteurs du NMD.

1.3.8.4. Implications biofonctionnelles du SMD

Cicatrisation des plaies cutanées : SERPINE1 stimule la cicatrisation cutanée en favorisant la migration des cellules tout en inhibant leur prolifération (186). La guérison des plaies est un processus cellulaire et moléculaire complexe qui restaure l'intégrité de la peau après une blessure et implique une inflammation, une migration cellulaire, une angiogenèse, un remodelage matriciel et une réépithélialisation (187). Le niveau d'ARNm de SERPINE1 augmente rapidement en réponse à une "blessure" expérimentale au niveau des cellules épithéliales rénales T2 ainsi que les kératinocytes. Cette blessure étant réalisée par une «rayure» dans une plaque de culture tissulaire de cellules adhérentes et presque confluentes. Par ailleurs, il a été observé que l'inhibition de l'expression de SERPINE1 nuit à la cicatrisation de la plaie, telle que surveillée par le taux de migration des cellules T2 dans la rayure (188).

Les kératinocytes HaCaT humains fournissent également un modèle *in vitro* intéressant pour l'étude de la cicatrisation cutanée. Les expériences sur la cicatrisation réalisées dans les cellules HaCaT montrent que 1/2-sbsRNA1, le LncRNA régulant SERPINE1 (178), inhibe la cicatrisation cellulaire des HaCaT après la réalisation d'une rayure expérimentale. Il s'avère que le 1/2-sbsRNA1 cible également RAB11FIP1 pour le SMD (178). La surexpression de RAB11FIP1 (RAB11 family interacting protein 1) améliore la motilité des cellules épithéliales non tumorales MCF10A (189). Comme on pouvait s'y attendre, la régulation négative de SERPINE1 ou de RAB11FIP1 par le 1/2-sbsRNA1 a retardé la cicatrisation des HaCaT. Il est remarquable en outre que l'inhibition de 1/2-sbsRNA1, qui n'est pas le seul ARN 1/2-sbs prédit par calcul pour s'apparier à l'ARNm de SERPINE1 ou l'ARNm de RAB11FIP1, suffit pour induire la motilité des kératinocytes.

Le rôle du 1/2-sbsRNA1, constaté dans le cas de la cicatrisation cellulaire, a probablement une pertinence pour d'autres voies impliquant la motilité des cellules humaines.

On pourrait penser notamment à la régénération axonale et la transition épithélio-mésenchymateuse qui accompagne les cancers métastatiques.

Myogenèse : Gong et ses collègues (184) ont observé que l'abondance cellulaire de STAU1 diminue au cours de la différenciation des myoblastes squelettiques de souris, C2C12 (MB) en myotubes multinucléés (MT). Cependant, l'abondance cellulaire d'UPF2 a été réduite encore plus que celle de STAU1. En conséquence, la co-immunoprécipitation de STAU1 et UPF1 a été augmentée, alors que la co-immunoprécipitation d'UPF2 et UPF1 a été réduite. Conformément à ces résultats, l'efficacité du SMD a été augmentée, tandis que l'efficacité du NMD a été diminué. Ces données prennent tout leur sens en considérant que l'ARNm de PAX3 (paired-box 3) est une cible SMD codant pour un facteur de transcription qui inhibe la myogenèse (190), tandis que l'ARNm de Myogénine, qui code pour un facteur pro-myogenèse, est une cible NMD (184). Pour ces raisons, et du fait que le mécanisme d'action du SMD implique l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de Staufen, l'évolution du SMD par rapport au NMD pendant la myogenèse est critique pour ce processus de différenciation (revoir la section 1.3.8.3). Il en est de même du niveau d'expression de STAU1 dont la baisse observée, bien que modérée, n'est pas anodine. En effet, le laboratoire du professeur Jasmin à l'université Ottawa a montré que maintenir, d'une manière stable, une forte expression de STAU1 dans les C2C12, empêchait leur différenciation en stimulant la traduction de c-Myc, un facteur pro-prolifération qui inhibe l'expression d'autres facteurs de la différenciation comme MyoD (191). Avec des niveaux élevés, STAU1 peut également inhiber la traduction de MyoD en s'associant au 3'UTR de son ARNm, et d'une manière indépendante du SMD (192). Cette sensibilité de la différenciation par rapport aux niveaux de STAU1 reflète d'une manière très forte la complexité de son implication dans ce processus physiologique et met encore plus en évidence l'aspect multifonctionnel de son influence post-transcriptionnelle.

L'adipogenèse : Le SMD est également impliqué dans l'adipogenèse, un autre processus de différenciation cellulaire par lequel les pré-adipocytes se développent en adipocytes. Les adipocytes, un composant du tissu adipeux, jouent un rôle crucial dans le maintien de l'énergie, l'homéostasie métabolique, la réponse immunitaire et le contrôle de la pression artérielle (193). L'altération du compartiment adipeux provoque des maladies

métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type 2 et les lipodystrophies (193). Cho et ses collègues (181) avaient constaté que l'abondance de STAU1 et de PNRC2, elle-même liée à l'homéostasie énergétique et à l'obésité (194), augmente pendant la conversion des pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes. Par exemple, les souris PNRC2^{-/-} sont maigres et résistantes à l'obésité induite par le régime alimentaire riche en matières grasses, car elles consomment plus d'oxygène, produisent plus de chaleur et ont une masse adipeuse réduite et des niveaux de leptine plus faibles que les souris normales (194). PNRC2 s'associe à STAU1 via UPF1 hyperphosphorylée (195), et la régulation négative du PNRC2 augmente l'abondance de l'ARNm de SERPINE1, qui est utilisé comme marqueur d'efficacité pour le SMD. Ainsi, comme dans le cas de la myogenèse, l'efficacité du SMD augmente durant l'adipogenèse, tandis que l'efficacité du NMD diminue (181). Durant l'adipogenèse, le SMD cible particulièrement l'ARNm KLF2 (Krüppel-Like Factor 2) (181). KLF2 code pour un facteur anti-adipogène (196) qui induit la caveoline-1, principale composante des cavéoles dans la membrane plasmique (197). Le KLF2 inhibe également le récepteur activé PPAR γ , un facteur de transcription essentiel pour l'absorption des lipides et l'adipogenèse (198). Ainsi, la régulation négative de STAU1, PNRC2 ou UPF1 retarde l'induction de PPAR γ , et inhibe donc l'adipogenèse. Ces résultats, plus l'interaction accrue entre STAU1 et UPF1 hyperphosphorylée par SMG1 (181) au cours de l'adipogenèse, qui est essentielle pour une SMD efficace (180), indiquent que SMD facilite l'adipogenèse en régulant à la baisse les facteurs anti-adipogènes.

Le SMD, qui réduit généralement l'abondance de l'ARNm d'une manière sensible, est considéré plus comme « affineur » de l'expression génique, un rôle qui incombe également aux miARN (199, 200). Malgré son modeste effet sur l'abondance de l'ARNm, la dégradation des ARNm induite par Staufen contribue d'une manière cruciale à la diversité des types cellulaires et à leurs réponses aux changements intra et extracellulaires au cours du développement, de la différenciation et aux facteurs du milieu environnemental en continuels changements.

1.3.9. STAU1 et la traduction : influence et implications biologiques

STAU1 se lie aux ribosomes par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant de la liaison à l'ARN, ainsi que des interactions protéine-protéine, facilités par dsRBD3 et

dsRBD4/TBD, respectivement (201). Ceci conduit vraisemblablement à une traduction améliorée par modulation de l'activité ribosomique et/ou l'augmentation de la formation des polysomes (168, 201). En raison du fait que les ribosomes sont associés au cytosquelette (202), la liaison aux ribosomes et au réseau de microtubules cellulaires peut avoir lieu simultanément (201).

La traduction d'ARNm est réprimée pendant le transport, mais elle est ensuite désinhibée, ce qui se traduit par une synthèse protéique localisée. La localisation ciblée des ARNm est un processus important en terme de régulation de l'expression des gènes et donc pour la distribution des protéines à l'intérieur de la cellule. STAU1 jouerait un rôle important dans ce contexte, particulièrement étudié dans les cellules neuronales (163, 203-205) et dans le cas de la réplication virale (206). À l'exception de l'étude menée par le laboratoire Moore, suggérant que STAU1 pourrait jouer un rôle global dans la régulation de la traduction, au niveau de l'étape d'élongation (207), plusieurs autres travaux stipulent que Staufen1 agit plutôt sur des populations spécifiques d'ARNm (121, 160, 168, 169, 208).

1.3.9.1. STAU1 se lie au 5'UTR pour faciliter la traduction

Des ARNm réprimés en traduction ont été générés en fusionnant l'élément de réponse trans-activateur (TAR) du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 structuré à l'extrémité 5' d'un transcrit rapporteur. La structure TAR constitue un site de reconnaissance par STAU1. Dans les lysats de réticulocyte de lapin et dans les cellules cultivées de mammifères, l'expression de Staufen1 a entraîné une régulation positive de l'activité du rapporteur lorsque la traduction était entraînée par l'ARN porteur de TAR. En revanche, Staufen1 n'a eu aucun effet sur la traduction des ARNm efficacement traduits dépourvus d'une extrémité 5' structurée apparente, suggérant que la liaison de Staufen1 à l'extrémité 5' est nécessaire pour une traduction améliorée. De manière cohérente, l'activité de liaison à l'ARN de Staufen1 est nécessaire pour cet effet de traduction. De plus, une régulation positive similaire de la traduction a été observée lorsque Staufen1 était attachée à l'extrémité 5' des ARNm via d'autres ARN structurés, le plus haut niveau d'augmentation de la traduction étant obtenu avec le site de liaison à Staufen1 du transcrit ARF1. L'expression de Staufen1 a favorisé le chargement polysomique des transcrits de TAR-luciférase résultant en une traduction améliorée. Ces résultats, rapportés par le laboratoire DesGroseillers, supportent un

modèle dans lequel l'expression de Staufen1 et son interaction avec l'extrémité 5'UTR de l'ARN et des ribosomes facilitent l'initiation de la traduction (168).

1.3.9.2. La liaison de STAU1 aux *IRAlu* des 3'UTR favorise la traduction en défiant l'activité $p54^{nrb}$ et PKR

D'après les travaux réalisés au laboratoire Maquat, et publiés en 2013 (209), STAU1 se lie aux *IRAlu* (Inverted Repeat *Alu* elements) présents aux 3'UTR de certains transcrits, pour inhiber leur rétention nucléaire et encourager leur exportation dans le cytoplasme. De plus, leurs résultats suggèrent que STAU1, lié à ces *IRAlu*, améliore la traduction des ARNm concernés. Ces deux étapes, la première étant nucléaire, et la deuxième, cytoplasmique, constituent une dynamique de compétition STAU1- $p54^{nrb}$ et STAU1-PKR, respectivement. $p54^{nrb}$ s'associe avec le long ARN non codant hNEAT1 pour séquestrer les ARNm cibles dans le noyau. Quant à PKR, une fois liée à l'ARNm cible, elle induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2α (eIF2 α), et la répression subséquente de la traduction (figure 17).

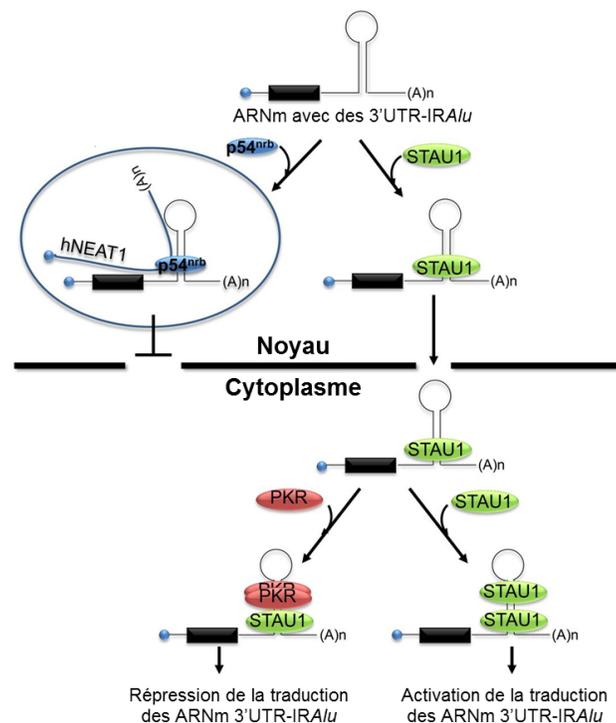


Figure 17. Mode d'action de STAU1 dans l'activation de l'export nucléaire et de la traduction des ARNm 3'UTR-IRAlu. Adaptée de (209)

Ainsi, STAU1, se liant aux 3'UTR-IRAlu, affecte la rétention nucléaire des transcrits 3'UTR-IRAlu, pour supprimer l'arrêt de la traduction cellulaire déclenchée par PKR qui se lie aux ARN double-brins cytoplasmiques endogènes. Sur le plan fonctionnel et physiologique, les auteurs ont pu montrer qu'un changement du ratio STAU1/PKR contribue à la myogenèse, via des effets sur les 3'UTR-IRAlu de l'ARNm codant pour LIN28, une protéine bien connue pour son rôle dans les processus de différenciation et de prolifération, notamment via son association aux microARN (210).

1.3.9.3. Les duplex intramoléculaires impliquent STAU1 dans divers processus

Une grande variété de duplex intramoléculaires existe dans la cellule, les structures secondaires au 5'UTR et les IRAlu au 3'UTR en font partie (voir les deux sections précédentes). L'approche par hiCLIP (RNA hybrid and individual-nucleotide resolution ultraviolet cross-linking and immunoprecipitation) montre que la majorité des duplex sont situés dans la région 3'UTR d'un transcrit, par rapport à une proportion réduite trouvée dans la séquence codante (CDS) et en 5'UTR (208). En l'occurrence, des duplex d'ARN à longue portée de plus de 500 nt de longueur ont été identifiés principalement dans la région 3'UTR, plusieurs comprenant des régions, juste en aval du codon stop, qui s'hybrident à des séquences proches du site poly (A). Les transcrits avec les duplex 3'UTR montrent un enrichissement pour les annotations de trafic protéique, par l'analyse des termes GO. Ceci suggère que beaucoup de ces transcrits pénètrent dans la voie sécrétoire avec une traduction localisée au réticulum endoplasmique (RE) rugueux. Les transcrits, beaucoup moins nombreux, avec des duplex situés au CDS, sont annotés pour la localisation nucléaire et la mitose (figure 18).

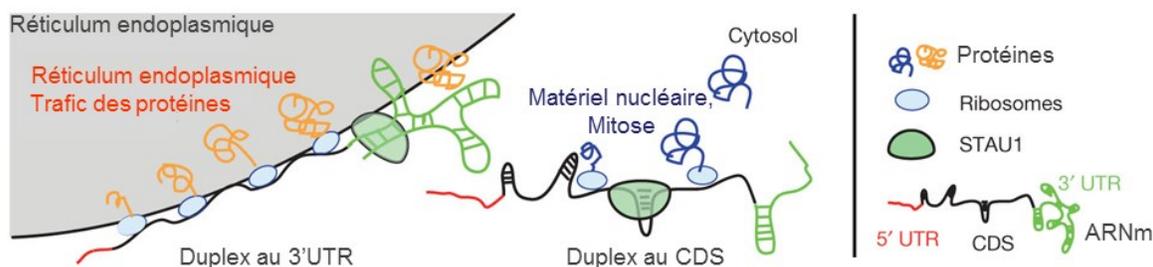


Figure 18. Représentation schématique des analyses fonctionnelles des cibles de STAU1, présentant des duplex intramoléculaires. Adaptée de (208).

En conclusion, le hiCLIP a permis de définir deux fonctions distinctes pour STAU1. Il est probable que les transcrits destinés à être traduits au niveau du RE rugueux forment des structures d'ARN secondaires, avec des duplex dans la région 3'UTR. Ceux-ci sont reconnus par STAU1 et transportés vers le RE. Dans ce cas, l'augmentation observée dans la concentration de ces transcrits après la déplétion de STAU1 (208) indiquent une possible fonction de STAU1 dans le SMD comme il a été discuté précédemment (183). En outre, la protéine STAU1 se lie aux transcrits avec des duplex dans le CDS, moins structurés que ceux dans le 3'UTR, et pourrait contrôler, à plus faible mesure leur expression. Il s'agit de transcrits impliqués dans la localisation nucléaire et la mitose.

Ces structures intramoléculaires s'avèrent d'autant plus importantes que Sugimoto et ses collègues observent une pression sélective intéressante pour les régions qui forment des duplex: le nombre de variations génétiques sous forme de polymorphismes mononucléotidiques (SNP) dans les séquences de formation de duplex est nettement faible en comparaison aux SNP dans les séquences environnantes. Cette différence s'est révélée être plus importante pour les longs duplex en 3'UTR. Ces observations suggèrent l'importance des longs duplex pour l'organisme, car la perturbation de ces structures par des mutations, et donc l'inhibition de leur interaction avec STAU1, pourrait provoquer des anomalies cellulaires qui pourraient conduire à la formation de maladies.

1.3.9.4. L'association STAU1-LncRNA stabilise les ARNm cibles

Un fait s'avère important : la plupart des duplex liés à STAU1 (environ 96%) sont des interactions intramoléculaires qui se produisent entre séquences d'un même transcrit (voir les trois sections précédentes), alors que les interactions intermoléculaires se produisent rarement (208). Les associations avec de longs ARN non codants (LncRNA) sont également rares, mais enrichies parmi les duplex intermoléculaires. De tels duplex sont similaires à l'association de STAU1 avec TINCR (un long ARN non codant induit par la différenciation terminale), qui guide STAU1 vers les ARNm cibles, pour les stabiliser et assurer leur expression. Ceci se trouve bien illustré avec le rôle du tandem STAU1-TINCR dans la différenciation des tissus épidermiques, entre autres via la stabilisation des transcrits pro-différenciation comme KRT80 et PGLYRP3 (211).

1.3.10. STAU1 est un acteur potentiel de la prolifération cellulaire et du développement tumoral

La polyvalence fonctionnelle de STAU1 dans le contexte de la régulation post-transcriptionnelle laisse à deviner l'étendue des cibles ribonucléotidiques de cette protéine. D'un côté, les études à grande échelle qui ont ciblé les ARNm (121, 160, 169), les sites de liaison (121, 168, 174), les structures convoitées (207, 208) et même les partenaires protéiques impliqués dans le réseau STAU1 (205, 212-214), ne dessinent qu'une ébauche du portrait total de l'influence post-transcriptionnelle de STAU1. D'un autre côté, en essayant de catégoriser les ARN cibles de STAU1 sur un plan fonctionnel, on se rend compte de la diversité des voies de signalisations et des mécanismes moléculaires concernés.

Nous savons donc que STAU1 cible une large panoplie d'ARNm impliqués dans différents réseaux de signalisation et ce, dépendamment du type tissulaire et cellulaire, du stade de développement, des complexes protéiques associés et des stimuli intra et extracellulaires mis en jeu. On parle notamment de développement neuronal (215), de plasticité synaptique (204, 216), de réponse au stress (213, 217) et de différenciation de nombreux types tissulaires et cellulaires comme la myogenèse et l'adipogenèse (183, 218).

Dans la présente section, nous focaliserons notre regard sur les cibles de Staufen1, impliquées dans la prolifération, la régulation du cycle cellulaire et la tumorigenèse.

La première étude ayant révélé des cibles potentielles de Staufen1 a été publiée conjointement par les laboratoires DesGroseillers et Maquat en 2005. Réalisés dans des cellules de rein transformées, par une approche classique de RIP (immunoprécipitation à l'ARN) de HA-Stauf1, suivie d'une analyse par hybridation sur micropuces, ces travaux ont pu identifier plus d'une vingtaine d'ARNm associés aux complexes ribonucléoprotéiques de STAU1. Certaines de ces cibles potentielles ont été confirmées par des approches plus ciblées *in vivo* et *in vitro*. C'est le cas notamment du facteur de ribosylation de l'ADP 1 (ARF1), la première cible confirmée du SMD (121, 169). Parmi les cibles identifiées, certaines semblent être impliquées dans la croissance et la prolifération, et d'autres dans le développement tumoral. C'est le cas entre autres de MCM4, de GDF1 et d'AAMP.

En 2007, le même duo a abordé cette question par des approches différentes (169). Dans la lignée de cellules cancéreuses HeLa, les auteurs ont inhibé l'expression de STAU1 par des petits ARN interférents ciblant son ARNm. Ils ont ensuite analysé par hybridation sur micropuces le profil d'expression génique résultant de cette chute d'expression transitoire. Les résultats montrent que suite à cette démarche, et avec un seuil de différence de 2 fois (2X), 1,1% du transcriptôme analysé est augmenté alors que 1% en est diminué. Une analyse plus ciblée par PCR quantitative de certains transcrits régulés positivement a confirmé que la diminution des niveaux cellulaires de STAU1 augmente l'abondance de ces ARNm. En l'occurrence, les transcrits codant pour (1) le proto-oncogène c-jun, (2) l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, Serpine1, (3) le récepteur de l'interleukine-7 (IL7R) et (4) la protéine associée à la croissance (GAP) 43 ont été examinés en détail. La séquence 3'UTR de chaque transcrit se lie à STAU1. De plus, chaque région 3'UTR était suffisante pour induire une augmentation de la demi-vie d'un ARNm hétérologue après inhibition de STAU1 ou UPF1. Toutes ces cibles sont impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription ou de la traduction, dans la réponse immunitaire et dans la mobilité et l'adhésion cellulaire. En somme, ces cibles SMD, confirmées *in vivo* et *in vitro*, ont une influence potentielle, directe et indirecte, sur la prolifération cellulaire et le développement tumoral.

Les études sur le SMD ont illustré l'importance de STAU1 pour l'homéostasie cellulaire, dont les données actuelles ne constituent probablement que la «pointe de l'iceberg». Par exemple, le SMD vise l'ARNm codant pour c-JUN (169), qui forme, avec c-FOS, le facteur de transcription AP1. Puisque AP1 régule la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'organogenèse et la réponse au stress (219, 220), il s'ensuit par déduction que le SMD en fait de même.

Avec le développement révolutionnaire des techniques d'immunoprécipitation, de purification, d'hybridation et de séquençage des acides nucléiques, ainsi que la sophistication des logiciels d'analyse bio-informatique, plusieurs familles de cibles directes de STAU1 ont été découvertes, et leurs catégorisations fonctionnelles ont été établies. Malgré des divergences majeures entre les découvertes qui ont été faites –certainement dues aux techniques adoptées et aux modèles cellulaires utilisés- un consensus est établi quant à

l'implication potentielle de STAU1 dans le ciblage des transcrits codant pour des protéines impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération et la tumorigenèse. On énumère entre autres un rôle dans le ciblage des transcrits par export nucléaire, par l'activation de la traduction ou par SMD. Des fonctions découvertes récemment font état d'un rôle confirmé dans la régulation de la prolifération, du cycle cellulaire, de l'adhésion et de l'invasion cellulaire ainsi que de l'apoptose et ce, dans des contextes tels que le cancer gastrique, colorectal et du sein (221-228). Bien que les mécanismes élucidés dévoilent parfois des fonctions contradictoires, entre activation carcinogène et suppression tumorale, il paraît très clairement que STAU1 est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et la carcinogénèse.

Dans des cas de cancer gastrique (CG) par exemple, les niveaux élevés du facteur de transcription E2F1 entraînent une transcription massive du lncRNA TINCR. Ce dernier s'associe à STAU1 et induit le SMD de l'ARNm codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire CDKN2B. Cette étude suggère que la voie oncogène E2F1/TINCR utilise le SMD pour promouvoir la prolifération des cellules cancéreuses (228). L'expression de TINCR peut être également être exacerbée par le facteur de transcription SP1, pour promouvoir la prolifération cellulaire et la tumorigénicité des cellules GC. Ce mode d'action passe aussi par le SMD qui cible le transcrit de KLF2, un facteur de transcription qui régule l'expression des inhibiteurs de CDK (225). Un autre lncRNA, HOXA11-AS, est surexprimé dans plusieurs tissus et lignées CG, s'associe à Staufen1 pour induire la dégradation de l'ARNm de KLF2, afin de développer le potentiel métastatique des cellules tumorales (224). L'implication de STAU1 dans l'activité métastatique a été également suggérée par l'augmentation marquée de ses niveaux d'expression dans les lignées cancéreuses du sein ayant métastasé dans le cerveau (221).

Certaines fonctions de STAU1 agissent dans certains cas comme antagonistes aux voies oncogènes. C'est le cas du cancer colorectal, où le long ARN non codant SNHG5 entre en compétition avec STAU1 afin de prévenir l'apoptose induite par le SMD, et ainsi promouvoir la survie des cellules cancéreuses (223).

Une conclusion sur le rôle de Staufen1 dans la régulation de l'apoptose reste mitigée, et certaines conclusions semblent contradictoires, quoiqu'on pourrait assumer que ces

divergences peuvent être associées aux modèles cellulaires et aux contextes biologiques concernés. Nous avons exposé précédemment (section 1.3.9.2) un rôle positif de STAU1 dans l'export nucléaire de transcrits pour promouvoir leur traduction (209). Dans des lignées de cellules transformées (HEK293) et non transformées (WI38), Yang et ses collègues, font état d'une compétition nucléaire entre le facteur d'édition nucléotidique ADAR1 et STAU1 pour la régulation de l'apoptose. Leurs résultats suggèrent qu'ADAR1 inhibe l'export nucléaire, induit par STAU1, des ARNm codants pour les oncogènes XIAP et MDM2. Cette rétention nucléaire empêche leur expression et par conséquent, inhibe les cascades de signalisation anti-apoptotiques qui en résultent (222). Dans des cellules de glioblastome A172, et dans des conditions spécifiques de stress induits par l'UV ou par le choc thermique, l'isoforme p110 de ADAR1 est transporté dans le cytoplasme afin d'inhiber le SMD des gènes anti-apoptotiques, et ainsi promouvoir la survie cellulaire (227).

À la lumière de ces travaux, nous pouvons dire qu'il existe une relation fonctionnelle ambivalente entre ADAR1 et STAU1. Entre le noyau et le cytoplasme, dans des conditions normales ou de stress, faisant intervenir l'un ou l'autre des isoformes d'ADAR1, et impliquant la fonction d'export nucléaire ou le SMD de STAU1 : le contexte cellulaire et physiologique est crucial pour déterminer le rôle de STAU1 dans la réponse apoptotique. Dans cette optique, il devient probable que les voies régulatrices impliquant STAU1 peuvent être empruntées par les effecteurs de l'apoptose ou celle de la survie cellulaire pour orienter l'évolution tumorale.

1.4. Hypothèses de recherche

Toutes ces études sur le rôle de STAU1 dans la régulation post-transcriptionnelle nous disent combien cette protéine est pleine de possibilités. La multitude d'implications et de voies de signalisation paraissent de plus en plus nombreuses et diversifiées, tant au niveau des cibles ribonucléotidiques (duplex inter et intramoléculaires, régions 3'UTR, 5'UTR et régions codantes) qu'au niveau des partenaires protéiques. Dépendamment de la voie de signalisation, des agonistes ou antagonistes protéiques, de la région ciblée ou de la localisation cellulaire, STAU1 a la capacité de spécifiquement initier, augmenter ou inhiber la traduction des transcrits cibles, jouer sur leur épissage alternatif, leur localisation et leur transport, et même sur leur stabilité.

L'ampleur de son impact représente un enjeu essentiel pour la gouvernance de certains processus cellulaires et biologiques importants. Cet impact est évident dans le cas de la différenciation tissulaire et du développement, des maladies neurodégénératives et musculaires, ainsi que sur le développement tumoral.

D'une part, les découvertes fréquentes et intensifiées ces dernières années, d'une panoplie de cibles de STAU1, associées potentiellement à la régulation du cycle cellulaire et au développement tumoral, laissent à penser que cette protéine pourrait adopter, dans certains tissus et lignées cellulaires, et dans certains contextes, le rôle d'un régulateur/effecteur de la prolifération/cycle cellulaire.

D'autre part, la variabilité des niveaux de STAU1, observée selon les stades du développement embryonnaire, de la différenciation cellulaire et du développement tumoral, suggère que son abondance serait sujette à des mécanismes de régulation de l'expression qui demandent à être élucidés.

Nous fondant sur ces deux éléments de réflexion, nous avons avancé l'idée que STAU1 est un régulateur post-transcriptionnel de la prolifération, et que son expression, comme celle des acteurs clés du cycle cellulaire, est modulée au cours des différentes transitions. Les mécanismes qui régissent cette modulation sont évidemment à caractériser, ainsi que ceux contrôlant le devenir de ses cibles post-transcriptionnelles au cours du cycle cellulaire.

La nature exacte de l'influence que STAU1 exerce sur chacune des transitions du cycle cellulaire est, en conséquence, un terrain relativement vierge qui reste à explorer dans différents contextes biologiques.

2. Résultats

2.1. Article 1: Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1

2.1.1. Mise en contexte

À l'époque où nous entreprenions les travaux ayant mené à la publication de cet article, plusieurs études s'étaient succédé pour identifier, d'une manière exhaustive, tous les messagers pouvant s'associer aux complexes RNP contenant STAU1, et d'autre part, pour définir l'influence de STAU1 sur leur stabilité/activité.

Une lecture comparative des résultats de toutes ces études met en évidence une régulation axée sur des voies spécifiques impliquées dans le métabolisme et la prolifération. Nous avons reconnus entre autres des cibles codant pour c-JUN, E2F2, CYCLINE D3, SERPINE1 et plusieurs protéines MCM. Cette analyse suggère donc la notion de régulons, où STAU1 exécute un programme de régulation ciblée de certains processus en contrôlant l'expression de l'ensemble des ARNm impliqués dans la voie de signalisation correspondante. Bien que ces études étaient en grande partie à large échelle, et avec des approches expérimentales qui demandaient à être complétées et validées, elles suggéraient un rôle probable de STAU1 dans la régulation post-transcriptionnelle de la prolifération cellulaire. Ce rôle devait être en partie traduit, comme pour la majorité des effecteurs de la prolifération, par une modulation de son expression durant le cycle cellulaire.

Dans cette étude, nous avons donc testé cette hypothèse, et les résultats nous ont permis d'une part, de mettre en évidence un mécanisme de dégradation de STAU1 en sortie de mitose, et d'autre part, de suggérer un rôle essentiel dans la régulation de cette transition, ainsi que de la prolifération de cellules transformées, et notamment de cellules issus du cancer colorectal.

Cette étude a été publiée dans la revue *Nucleic Acids research* (244).

Notes :

Contribution des auteurs :

K. Boulay* : Synchronisations cellulaires, analyses par FACS, essais d'inhibition du protéasome, essais d'ubiquitination, co-immunoprécipitations, construction de vecteurs d'expression de STAU1, essais de formation de colonies, courbes de croissance, essais de coexpression STAU1-CDC20/CDH1 et écriture du manuscrit.

Figures : 1A, 1B, 2A, 2C, 3C, 4A, 4C, 6A, 6B, 6C, 6D, S1

M. Ghram* : Synchronisations cellulaires, analyses par FACS, essais d'inhibition du protéasome, essais d'ubiquitination, co-immunoprécipitations, essais de formation de colonies, courbes de croissance, essais de coexpression STAU1-CDC20/CDH1, essais d'inhibition de CDC20/CDH1, essais d'analyse de la quiescence et de l'apoptose et contribution à l'écriture du manuscrit.

Figures 1A, 1C, 2A, 2B, 3A, 3B, 4B, 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, S1, S2A, S2B

W. Viranaicken : Synchronisations cellulaires, analyses par FACS, essais d'inhibition du protéasome, essais de formation de colonies, courbes de croissance.

V. Trépanier : Isolation d'ARN et RT-qPCR.

C. Fréchina : Construction des vecteurs d'expression de CDC20 et CDH1, assistance technique.

L. DesGroseillers : Supervision générale et écriture du manuscrit.

* Contribution égale des deux premiers auteurs, tel qu'indiqué sur la première page du manuscrit.

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

Karine Boulay¹, Mehdi Ghram¹, Wildriss Viranaicken², Véronique Trépanier, Stéphanie Mollet, Céline Fréchina³ and Luc DesGroseillers[#]

Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada

Running title : Down-regulation of Stau1 during mitosis

[#] To whom correspondence should be addressed:

Dr Luc DesGroseillers, Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Pavillon Roger-Gaudry, Montréal, QC, Canada. H3T 1J4. Phone : 514-343-5802. Fax: 514-343-2210. Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trepanier V, Mollet S, Fréchina C, et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul;42(12):7867-83.

¹ The first two authors contributed equally to this work

² Present address: GRI (Groupe de recherche en immunopathologies et maladies infectieuses), Université de la Réunion.

³ Present address: CYROI, Cyclotron Réunion Océan Indien, Université de la Réunion.

2.1.2. Abstract

Staufen1 (Stau1) is an RNA-binding protein involved in the post-transcriptional regulation of gene expression. Recent studies indicate that Stau1-bound mRNAs mainly code for proteins involved in transcription and cell cycle control. Consistently, we report here that Stau1 abundance fluctuates through the cell cycle in HCT116 and U2OS cells: it is high from the S phase to the onset of mitosis and rapidly decreases as cells transit through mitosis. Stau1 down-regulation is mediated by the ubiquitin-proteasome system and the E3 ubiquitin ligase anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). Stau1 interacts with the APC/C co-activators Cdh1 and Cdc20 via its first 88 N-terminal amino acids. The importance of controlling Stau1⁵⁵ levels is underscored by the observation that its overexpression affects mitosis entry and impairs proliferation of transformed cells. Microarray analyses identified 275 Stau1⁵⁵-bound mRNAs in prometaphase cells, an early mitotic step that just precedes Stau1 degradation. Interestingly, several of these mRNAs are more abundant in Stau1⁵⁵-containing complexes in cells arrested in prometaphase than in asynchronous cells. Our results point out for the first time to the possibility that Stau1 participates in a mechanism of post-transcriptional regulation of gene expression that is linked to cell cycle progression in cancer cells.

2.1.3. Introduction

It is now well accepted that post-transcriptional mechanisms of gene regulation are active to properly link protein synthesis to cell needs (1,2). It was proposed that RNA-binding proteins and non-coding RNAs tag and group functionally related mRNAs into RNA regulons to ensure that proteins involved in a specific pathway are coordinately translated at the right time (1). As a consequence, even a slight modulation in the expression and/or activity of an RNA-binding protein is likely to profoundly affect the pathway(s) controlled by its bound mRNAs. In mammals, Staufen1 (Stau1) is a key factor in the post-transcriptional regulation of gene expression (3-6). Stau1 is a double-stranded RNA-binding protein that is ubiquitously expressed and alternative splicing of its mRNA generates protein isoforms of 55 (Stau155) and 63 (Stau163) kDa (7,8). Stau1 is involved in several post-transcriptional mechanisms that control gene expression including mRNA transport (4,5,9), translation (3,10,11), decay (6,12), nuclear export (13,14) and splicing (14). All these functions are likely very important for cell physiology as compelling data indicate that Stau1 is involved in cell differentiation (12,15-20), dendritic spine morphogenesis (9,21) and long-term synaptic plasticity (21), a cellular mechanism for long term memory. Therefore Stau1 is a multifunctional protein and many of its functions are related to post-transcriptional regulation of gene expression.

Recent studies identified Stau1-bound mRNAs and the cis-acting sequences responsible for Stau1 association (10,11,22-24). Essentially, two broad classes of Stau1-bound mRNAs were identified. A first class of transcripts contains inverted Alu sequences in their 3'UTR whereas a second class with GC-rich region forms high secondary structure-forming propensity in the coding region and 3'UTR. A large fraction of these mRNAs are associated with Stau1 on translating ribosomes (10,11,25). Genome-wide analyses reveal that Stau1-bound mRNAs code for proteins with heterogeneous functions mainly related to transcription, translation, cell growth, and regulation of cell cycle (10,11,22-24). Therefore, modulation of Stau1 level by cell cycle effectors may dictate the post-transcriptional expression of its bound transcripts and therefore may contribute to the control of cell proliferation. Indeed, Stau1 down-regulation protects several transcripts from degradation (12) while Stau1 overexpression increases ribosome occupancy of high-GC-content transcripts (10). Moreover, experimental evidence supported the hypothesis that Stau1 target selection is strongly influenced by Stau1

levels, probably due to the low complexity and redundancy of cis-acting binding sequences (23).

Many cell cycle effectors that maintain a tight control on the expression of downstream molecules involved in the progression of the cycle and in cell division are timely expressed through the cell cycle (26,27). To achieve their differential expression, these proteins are often subjected to cell cycle stage-specific targeted degradation via the ubiquitin-proteasome system (UPS), a general mechanism that controls their function and largely contributes to the unidirectionality of the cell cycle (28). The anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) and SKP1-Cul1-Fbox (SCF) complex are two major E3 ubiquitin ligases involved in the specificity of this process. Indeed, they play central roles from anaphase to the late G1 phase and from the end of G1 phase to early mitosis, respectively (29). APC/C activity is regulated through the cell cycle by its association with either of two activator subunits, Cdc20 and Cdh1. While Cdc20 activates APC/C during the metaphase to anaphase transition, Cdh1 maintains its activation from anaphase until the end of G1 phase (30). Cdc20 and Cdh1 selectively recruit APC/C substrates bearing sequence recognition motifs including the destruction boxes (D-box) and the KEN-box consensus sequences (31-33).

In this manuscript, we show that Stau1 levels decrease during mitosis transit via APC/C- and UPS-dependent mechanisms. Time-specific Stau1 degradation is likely important since imbalance of Stau155 levels impairs mitosis and cell proliferation. We also provide evidence that at least some transcripts are differentially associated with Stau155 in prometaphase and asynchronous cells.

2.1.4. Materials and methods

Plasmids, antibodies and reagents

Plasmids coding for HA-Cdh1 and HA-Cdc20 were obtained from Dr Michele Pagano (34) and GFP-Ubiquitin from Dr Michel Bouvier (35). FLAG-YFP, FLAG-Cdh1 and FLAG-Cdc20 were generated by PCR amplification of pCMV-YFP-topaz (Packard Bioscience/PerkinElmer LifeSciences), HA-Cdh1 and HA-Cdc20 and the resulting fragments were cloned in pFLAG-CMV6a (Sigma) that contains a cytomegalovirus promoter. Plasmids coding for pcDNA3-RSV-Stau155-FLAG and pcDNA3-RSV-Stau1 Δ 2-FLAG (identified as pcDNA-RSV-Stau1 Δ Nt88-Flag) and driven by a Rous Sarcoma virus promoter were previously described (36). Mutation of the Stau1 D-box sequence to generate pcDNA3-RSV-Stau1Dmut-FLAG was done by PCR-based site-directed mutagenesis using pcDNA3-RSV-Stau155-FLAG as a template. In this plasmid, the D-box consensus sequence R375XXL378 was changed for A375XXA378. To generate plasmids used for retroviral-mediated gene transfer, the coding sequences of Stau155-FLAG and Stau155-HA3 were amplified by PCR and the resulting fragments were cloned in the BglIII site of the retroviral vector pMSCVpuro (Cloneteck laboratories) that contains the Murine Stem Cell Virus promoter. To construct the pMSCVpuro-Stau155-FLAG3 plasmid, oligonucleotides (5'-GGCCTTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAG-3' and 5'-GGCCCTTGTCATCGTCATCCTTGTTAGTCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCAA-3') were hybridized and then inserted into the NotI sites of pMSCVpuro-Stau155-HA3 in replacement of the HA3-tag. pMSCVpuro-Stau1Dmut-FLAG3 was constructed as described above using pMSCVpuro-Stau155-FLAG3 as a template. To construct pMSCVpuro-Stau1 Δ 2-FLAG3, the coding sequence of Stau1 Δ 2-FLAG was first amplified by PCR and cloned in pMSCVpuro. Then, the EcoRI fragment of pMSCVpuro-Stau155-FLAG3 (containing the C-terminal coding sequence of Stau155 fused to the FLAG3 tag) was cloned into EcoRI-digested pMSCVpuro-Stau1 Δ 2-FLAG3 plasmid. Note that pMSCVpuro-Stau155-FLAG3, pMSCVpuro-Stau1Dmut-FLAG3 and pMSCVpuro-Stau1 Δ 2-FLAG3 were also used for transient transfections.

Antibodies against Cyclin A (CY-A1), β -Actin (Ac-74), FLAG (M2), HA (rabbit polyclonal) were purchased from Sigma; against phospho-Histone H3 (Ser10) (D2C8) and ribosomal protein S6 from Cell Signalling; against MPM2 and Aurora A from Abcam; against GFP from Roche Applied Science; anti-cyclin B1 from Santa Cruz and anti-PARP1 from New England Biolabs. Monoclonal antibodies against Stau1 (3) and HA (8) were previously described. SmartPool On-TARGETplus-Non-targeting siRNA #1 (control) and On-TARGETplus SMARTpool-Human Cdc20 siRNAs were purchased from ThermoFisher/Dharmacon.

Cell culture and synchronization

The human cell lines hTert-RPE1, IMR90, HEK293T, U2OS and phoenix retroviral packaging cells were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) or fetal bovine serum (Wisent), 100 μ g/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin (Wisent) (hereafter referred to as complete DMEM). HCT116 cells were maintained in McCoy's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin. Cells were cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. When required, 10 μ M MG132 (Enzo Life Sciences) was added to the medium for the indicated periods before harvesting the cells for western blots

HCT116 and U2OS cells were synchronized at the G1/S border using a thymidine double-block protocol (37). Briefly, cells were treated with 2 mM thymidine for 16 h and released for 8 h in fresh medium before the second block was performed for another 16 h with 2 mM thymidine. Cells were then washed three times in phosphate buffer saline (PBS) and either collected (hours after treatment = 0) or released in fresh medium for different time periods. For synchronization in prometaphase, HCT116 and U2OS cells were synchronized as described above. After that, cells were released in fresh thymidine free medium for 3 h then treated with 50 ng/ml nocodazole for 8 h. Round mitotic cells were recovered by gentle shaking of the culture dish (shake-off) (hours after release = 0) and re-plated in fresh medium for different time periods. HCT116 cells were also synchronized at the G2/M phase border using 10 μ M of the Cdk1 inhibitor RO-3306 (38) (Enzo Life Sciences Inc) for 18 h. Cells were then washed three times in phosphate buffer saline (PBS) and either collected (hours

after treatment = 0) or released in fresh medium for different time periods. For synchronisation in prometaphase, HEK293T cells were treated with 50 ng/ml nocodazole for 18 h.

DNA transfection and retroviral gene transfer

For transient expression, cells were transfected with lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Alternatively, cells were infected with retroviral particles as described previously (39) and selected with 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin for 2 days.

Flow cytometry analysis

Cell cycle distribution was determined by Fluorescence activated cell sorting (FACS). Cells were trypsinized and fixed in 70% ethanol at -20°C for at least 2 h. Cells were resuspended in PBS containing 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A. After incubation for 1 h at 37°C cells were characterized. Data was acquired using a BD LSRII apparatus and analyzed using the FlowJo. For each experiment, 104 cells were analyzed.

Growth curves and colony formation assays

Cells were selected with puromycin as described above. After selection, cells were plated at the same density (day = 0). For growth curve assays, cells were harvested every day and the number of cells was counted with a hemacytometer. For colony formation assays, cells were grown for a time period ranging from 10 to 14 days as indicated. Cells were then washed two times with PBS and coloured with 0.5% crystal violet in 50% methanol for 10 min. After extensive washes in water, plates were dried and scanned. Colony formation was determined by measuring absorbance at 590 nm using a spectrophotometer after dissolving colonies from dried plates in a solution containing 0.1 M sodium citrate (pH 4.2) and 20% methanol.

Apoptosis, senescence and quiescence

In parallel with the growth curve assays, infected cells were collected at day 4 after plating and tested for the presence of apoptotic, senescent and/or quiescent cells. The presence of apoptotic cells was evaluated by Western blotting using the anti-PARP1 antibody whereas quiescent cells were detected by FACS after labeling of the cells with pyronin Y (Sigma) and Hoechst (Fisher) as described (40). Senescent cells were also quantified by microscopy using SA- β -galactosidase activity as described (39).

Western blot analysis and immunoprecipitation

Total-cell extracts were prepared in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% triton X-100, 2 mM sodium fluoride, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]), and protein concentrations were determined by Bradford assays. Cell extracts (10 to 20 µg) were analyzed by Western blotting. Data were collected either on X-ray films (Fujifilm) or with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories) and the Western blot signals were quantified with the ImageLab (Bio-Rad Laboratories) software.

For immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins, transfected HEK293T cells were washed 3 times in PBS and protein extracts were prepared in lysis buffer 24 h post-transfection. Lysates were cleared by centrifugation at 15 000 g for 15 min. Immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins was performed with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) and the immune complexes were eluted with the FLAG peptide (Sigma-Aldrich) as previously described (41). For the analysis of Stau155-HA3 ubiquitination by immunoprecipitation, transfected cells were lysed as described above, except that cells were treated with 20 µM MG132 for 8 h and 10 mM N-ethylmaleimide was added to the non-denaturing lysis buffer. Cleared lysates were incubated with mouse monoclonal anti-HA antibody (12CA5) for 2 h at 4°C and then with protein A-sepharose beads for an additional 2 h at 4°C. Immune complexes were washed 3 times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 min in protein loading buffer. Protein expression before immunoprecipitation and immunoprecipitated complexes-associated proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting.

For microarray analysis and its validation, asynchronous and nocodazole-treated HEK293T cells were lysed in 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]. Stau155-FLAG was immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) and the immune complexes were eluted with the FLAG peptide (Sigma-Aldrich). Immunoprecipitation of endogenous Stau1-containing complexes was performed using the monoclonal anti-Stau1 antibody or the anti-HA antibody as a control, previously crosslinked to the protein A-sepharose beads with DMP (Thermo

Scientific). Immune complexes were eluted with 100 μ L of 2X SDS Loading Buffer. Protein expression before immunoprecipitation and immunoprecipitated complexes-associated proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting.

RNA isolation and RT-qPCR

To determine the steady state level of endogenous Stau1 expression in synchronized cells, RNA was isolated from cell extracts using the TRIZOL Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA was resuspended in 50 μ L water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Reverse transcription reactions were done with 750 ng of RNA, the MuLV RT enzyme and oligo-d(T) from the GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's procedure. Resulting cDNAs were qPCR amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the LightCycler 480 instrument (Roche). Sense and antisense sequences of the primer pairs used for the qPCR amplification were: Stau1, 5'-TTTGTGACCAAGGTTTCGGTTGGG-3' and 5'-TGGGCTTGTCTGTGGCTTGACTAT-3'; GAPDH, 5'-CATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3' and 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'.

For the validation of the microarray data, RNA was isolated using the TRIZOL Reagent as above. RNA was resuspended in 50 μ L (Inputs) or 20 μ L (IPs) of water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). The reverse transcription reactions were done with 750 ng of Input RNA or 3 μ L of IP RNA using the MuLV RT enzyme from the GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's procedure. Specific antisense primers were used to produce corresponding cDNAs:

RPL22:	5'-TTGCTGTTAGCAACTACGCGCAAC-3',	APAF1:	5'-
	TTTGCGAAGCATCAGAATGCGGAG-3',	RB1:	5'-
	TGAGCACACGGTCGCTGTTACATA-3',	SPBC24:	5'-
	ACTCCAGAGGTAGTCGCTGATGAA-3',	JUB:	5'-
	AACAAGCTCCACACCCACAGAGAT-3',	MOBKL2B:	5'-
	TGATGTGGAGAGCTTTGGGAAGGT-3',	VHL:	5'-
	TGACAAACCCTGACTGAAGGCTCA-3'.		

Resulting cDNAs were amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Applied Science) and the LightCycler 480 instrument (Roche Applied Science). Antisense primers were those used in the RT reactions and sense primers were: RPL22: 5'-TGGTGACCATCGAAAGGAGCAAGA-3', APAF1: 5'-GCAGAATCTTTGCACACGGTTGGA-3', RB1: 5'-TCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA-3', SPBC24: 5'-TTATGAGTGTGAGCCAGGGATGGT-3', JUB: 5'-GGTTGCTGCCTGTATTCCCTGTTT-3', MOBKL2B: 5'-TACCAGTTGTGCTTCAGCCTCCTT-3', VHL: 5'-TACATCCGTAGCGGTTGGTGACTT-3'.

Microarray analyses

RNA was isolated from the inputs and the IPs using the TRIZOL Reagent (Invitrogen) as above. RNA was resuspended in 50 μ L (Inputs) or 20 μ L (IPs) of water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Biotinylated cRNA probes were synthesized by the TotalPrep RNA labelling kit (Ambion). Illumina human genome arrays (Ref- HumanWG-6_V3 Expression BeadChip comprising 48,803 probe sets) were used for hybridization according to Illumina guidelines (n = 3). Hybridized chips were scanned using an Illumina iScan System. Results were recorded using the BeadStudio software platform. To identify mRNAs that specifically copurify with Stau1, signal intensities obtained for specific IPs were compared with those of control IPs using the FlexArray 1.6.2 software (Blazejczyk, M., Miron, M., Nadon, R. . (2007), Genome Quebec, Montreal, Canada, <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>). Background was corrected using negative controls. Variance stabilization (log base2), Sd correction in variance stabilizing transformation (VST) method and robust spline normalization were applied. Each probe set presenting a fold enrichment over control of more than 2.5 (t-test p value < 0.05) was scored as a potential Stau1-associated mRNA. Complete microarray analysis results can be found in the Supplemental Data. Microarray data have been deposited in the GEO database and are available through the series accession number GSE51182 and GSE51183.

2.1.5. Results

The levels of Stau1 protein vary during the cell cycle

To test the hypothesis that Stau1 expression is regulated in a cell cycle-dependent manner, the levels of Stau1 protein were studied in different phases of the cell cycle using synchronized cells. The colorectal carcinoma HCT116 cell line was arrested at the G1/S transition by a double thymidine block (DTB) and then released to allow their progression through the cell cycle. Cells were harvested at different time points after release as indicated (Fig. 1A). Analysis of Stau1 levels revealed a high and stable expression during the S and G2 phases followed by a striking decrease about nine hours post-DTB release, a decrease that parallels those of the mitotic markers cyclin B1 and Aurora A (Supplementary figure 1). FACS analyses indicated that at this time point, a large proportion of the cells have reached the G1 phase suggesting that Stau1 down-regulation occurred during mitosis and/or when cells reached the G1 phase of the cell cycle (Fig. 1A). Note that endogenous Stau155 and Stau163 behaved similarly in this experiment and in those described below. Therefore, quantification of Stau1 levels will be restricted to that of Stau1⁵⁵ which is the major isoform.

To more precisely determine the timing of Stau1 down-regulation, we synchronized HCT116 cells in prometaphase with nocodazole. Cells were then released from the block for different time periods and Stau1 levels were quantified. Stau1 level is high in prometaphase and rapidly decreased as soon as 1 h post-release (Fig. 1B) suggesting that Stau1 is down-regulated as cells progress through mitosis. HCT116 cell extracts were further analyzed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR). While the amounts of Stau1 protein significantly decreased upon release from the nocodazole-induced arrest, the steady-state level of Stau1 mRNA was not significantly different indicating that Stau1 down-regulation during mitosis is a consequence of reduced translation and/or increased degradation of the protein. Fluctuation of Stau1 levels through the cell cycle was confirmed in the human U2OS osteosarcoma cell line (Fig. 1C).

Stau1 is degraded by the ubiquitin-proteasome system (UPS)

As the mitotic destruction of many proteins such as Cyclin B1 is dependent on the UPS (28), asynchronous HCT116 cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 to

determine if Stau1 is degraded by this pathway. In the presence of the drug, the amount of endogenous Stau1 augmented about 2-fold suggesting that the pharmacological treatment protected it from proteolysis (Fig. 2A). As expected, the levels of Cyclin B1 also increased upon proteasome inhibition ($1,99 \pm 0,09$; p-value 0,002 Student's τ -test). Similar increases in Stau1 levels were obtained in HEK293T and U2OS cells (Fig. 2A). To support this result, expression of Stau1⁵⁵-FLAG was analysed in HEK293T cells grown in MG132 for different time periods (Fig. 2B). The protein was quickly stabilized as soon as 2 h post MG132 treatment. These observations strongly suggest that Stau1 is degraded by the UPS.

Proteins that are destroyed by the proteasome are usually tagged by the covalent addition of poly-ubiquitin chains (28). To test if Stau1 can be modified by ubiquitin, HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau155-HA3 and GFP-Ubiquitin. In the total cell extracts, several slow migrating bands were detected with the anti-HA antibody, in addition to Stau1⁵⁵-HA3 (Fig. 2C, left). These bands were only visible when Stau155-HA3 was co-transfected with GFP-Ubi, suggesting that the bands with reduced mobility correspond to ubiquitinated Stau1. To more precisely address this point, we immunoprecipitated Stau1⁵⁵-HA3 and determined if the slow migrating Stau1⁵⁵-HA3-containing bands also stained with an anti-GFP antibody (Fig. 2C, right). GFP-Ubiquitin was specifically found in the Stau1⁵⁵-HA3 immunoprecipitated extract and migrated as a smear, most likely because other ubiquitinated proteins were present in the immune complex. Altogether our data indicate that Stau1 is a substrate of the UPS.

The control of Stau1 levels during mitosis is mediated by Cdh1 and Cdc20

The down-regulation profile of Stau1 during mitosis that coincides with that of known APC/C substrates (Fig. 1A) and the observation that Stau1 can be degraded by the UPS suggest that it is a target of APC/C. Therefore, to determine whether APC/CCdc20 and/or APC/CCdh1 are involved in Stau1 destabilization, Stau1⁵⁵-FLAG3 was expressed along with HA-tagged Cdh1 or Cdc20 to increase APC/C activity in asynchronous HEK293T cells. Figure 3A clearly showed that enforced expression of either Cdh1 or Cdc20 significantly reduced Stau1⁵⁵-FLAG3 amounts indicating that Stau1⁵⁵ is a novel substrate of these proteins. To fully establish their involvement in endogenous Stau1⁵⁵ degradation, we down-regulated the expression of Cdc20 using siRNA and analyzed the levels of Stau1 expression during

mitosis. siRNA-transfected HCT116 cells were synchronized at the G2/M transition with the Cdk1 inhibitor RO-3306 (38) and then released from the block for 3h. As seen in figure 3B, endogenous Stau1 was not degraded at 3h post-release when isolated from siRNA-Cdc20-transfected cells as compared to control cells.

Because Cdh1 and Cdc20 contribute to substrate recognition and recruitment to APC/C, we tested whether Stau1⁵⁵ can associate with either Cdh1 or Cdc20. HEK293T cells were transfected with FLAG-YFP, FLAG-Cdh1 or FLAG-Cdc20 expressors. FLAG-tagged proteins were purified and co-immunoprecipitated proteins were analyzed. Endogenous Stau1⁵⁵ was detected in FLAG-Cdh1 and in FLAG-Cdc20 immune complexes (Fig. 3C) whereas it was absent in control conditions, showing specific Stau1⁵⁵/Cdh1 and Stau1⁵⁵/Cdc20 interactions. These results support the notion that Stau1⁵⁵ is a substrate of APC/CCdh1 and APC/CCdc20.

The N-terminal domain of Stau1⁵⁵ is required for its Cdh1- and Cdc20-dependent down-regulation

APC/CCdc20 and APC/CCdh1 usually recognizes substrates containing D-box and/or KEN-box consensus sequences (31-33). A search for these motifs revealed the presence of a conserved D-box motif in the C-terminal half of Stau1 (Fig. 4A). To test its functionality, the consensus sequence was mutated to generate Stau1Dmut (Fig. 4A). Then, HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for the wild type Stau1⁵⁵-FLAG3 or the D-box mutant protein and either HA-Cdc20 or HA-Cdh1 as described in figure 3A. Our results indicated that Stau1Dmut-FLAG3, as observed with the wild type Stau1⁵⁵-FLAG3, was sensitive to Cdh1- and Cdc20-dependent destabilization (Fig. 4B), suggesting that the putative D-box is not functional. Consistently, Stau1Dmut-FLAG3, as did Stau1⁵⁵-FLAG3, interacted with Cdh1 and Cdc20 as it was detected in HA-Cdh1 and in HA-Cdc20 immune complexes in a co-immunoprecipitation experiment (Fig. 4C).

As a means to identify a functional domain in Stau1⁵⁵ that confers Cdh1- and Cdc20-mediated degradation, we immunoprecipitated HA-Cdc20 and HA-Cdh1 complexes from cells that co-expressed a series of Stau1 deletion mutants. While deletion of most Stau1⁵⁵ domains did not impair Stau1 association with Cdh1 and Cdc20 (not shown), deletion of the first 88 N-

terminal amino acids of Stau1⁵⁵ (mutant Stau1Δ2) prevented it (Fig. 4C). Anti-ribosomal protein S6 was used as a positive control since ribosomes are known to co-immunoprecipitate with Stau1 (25). To determine if the deletion also has an impact on Stau1⁵⁵ stability, we co-transfected HEK293T cells with plasmids coding for Stau1Δ2-FLAG3 and either HA-Cdc20 or HA-Cdh1. Stau1Δ2-FLAG3 was protected from the Cdh1- and Cdc20-dependent destabilization (Fig. 4B), indicating that the first 88 N-terminal amino acids of Stau1⁵⁵ contributed to Stau1 degradation.

Deregulation of Stau1 expression impairs mitosis entry

To determine if the stabilization of Stau1Δ2-FLAG3 occurs during the cell cycle, HCT116 cells were infected with viruses expressing Stau1⁵⁵-FLAG3 or Stau1Δ2-FLAG3, synchronized at the G2/M transition with RO-3306 and released from the block for 3 or 5h. As expected, Stau1⁵⁵-FLAG3 was degraded during mitosis whereas Stau1Δ2-FLAG3 was not (Fig. 5A).

To understand the biological relevance of APC/C-mediated Stau1 decline and determine whether Stau1⁵⁵ stabilization is detrimental for mitosis, the impact of Cdh1/Cdc20-resistant Stau1Δ2-HA3 expression was studied. HCT116 cells were infected with viruses expressing the empty vector, Stau1⁵⁵-FLAG3 or Stau1Δ2-FLAG3. Infected cells were synchronized at the G2/M phase border with RO-3306 for 20 h and the block was released for different time periods. Western blotting indicated that expression of Stau1⁵⁵-FLAG3 and Stau1Δ2-FLAG3 was below that of the endogenous Stau1⁵⁵ and expression of Stau1Δ2-FLAG3 was higher than that of Stau1⁵⁵-FLAG3 (Fig. 5B). At each time point, cells were collected and analyzed by FACS to determine the percentage of cells in G1, as a means to compare the time it took to transit through mitosis and enter the G1 phase. Expression of Stau1⁵⁵-FLAG3 caused a delay in G1 entry as observed in 3 independently performed experiments (Fig. 5C). Indeed, at 3 h post-release, the number of cells in G1 was significantly reduced in Stau1⁵⁵-FLAG3-expressing cells as compared to control cells (Fig. 5D). A delay in G1 entry was also observed in Stau1Δ2-FLAG3-expressing cells although it was not significant (p-value = 0.07) as compared to cells infected with the empty vector (Fig. 5D).

To expand upon these results, we compared the percentage of cells in each phase of the cell cycle. We hypothesized that if the length of mitosis is increased in Stau1⁵⁵-FLAG3-expressing cells, the percentage of cells in this phase should be greater in these cells than in vector-infected cells. Asynchronous cells were collected 2 days post-infection and analyzed by FACS. Our data revealed that the percentage of cells in each phase of the cell cycle was quite similar for the 3 conditions (Fig. 5E). However, it is possible that the number of cells in the G2 phase (which is much longer than mitosis) masked a relatively small difference in the number of mitotic cells in asynchronous cells. To more specifically study cells in mitosis, we labeled infected cells with an antibody recognizing phospho-histone H3 (Ser10) before analysis by FACS. Our data indicated that the percentage of phospho-H3 positive cells is decreased in Stau1⁵⁵-FLAG3-infected cells as compared to control cells (Fig. 5F), suggesting that fluctuation of Stau1 level may impair the G2/M transition. In contrast, expression of Stau1 Δ 2-FLAG3 did not significantly change the percentage of mitotic cells as compared to control cells. Altogether, these results indicate that the levels of expression of Stau1 during the G2-M phases of the cell cycle influence the timing of mitosis and that the putative molecular mechanism that regulates mitosis entry involves the N-terminal domain of Stau1.

Stau1⁵⁵-FLAG3 expression impairs cell proliferation in transformed cell lines

To study the consequence of Stau1 level fluctuation on successive cell divisions, the impact of Stau1⁵⁵-FLAG3 and Stau1 Δ 2-FLAG3 expression on cell cycle proliferation was first assessed by growth curve assays. Expression of Stau1⁵⁵-FLAG3 and Stau1 Δ 2-FLAG3 at day 0 was below that of the endogenous Stau1⁵⁵ (Fig. 6A). Consistent with the mitotic effect described above (Fig. 5), expression of Stau1⁵⁵-FLAG3 clearly caused a proliferative defect (Fig. 6B). In contrast, expression of Stau1 Δ 2-FLAG3 had no visible deleterious effect on cell proliferation (Fig. 6B).

The long term effect of Stau1⁵⁵-FLAG3 and Stau1 Δ 2-FLAG3 expression was analyzed using a colony formation assay. Consistent with the growth curve experiments, our data indicated that S Stau1⁵⁵-FLAG3 expressing cells formed fewer/smaller colonies. In contrast, Stau1 Δ 2-FLAG3 expressing cells grew essentially as efficiently as cells infected with the empty vector (Fig. 6C). We further showed that expression of Stau1⁵⁵-FLAG3 or Stau1⁵⁵-HA3 also impaired cell proliferation in U2OS and HEK293T cells, respectively (Fig. 6D). In

contrast, Stau1⁵⁵-FLAG3 expression had no impact on cell proliferation when the colony formation assay was repeated in two non-transformed human cell lines, the hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell line htert-RPE1 and the human fetal lung fibroblast IMR90 cells (Fig. 6E). These results support the idea that deregulation of Stau1 protein levels is deleterious for proliferation of transformed cells and that the N-terminal domain is required for this function.

We next determined if the knockdown of Stau1 expression had a similar detrimental effect on cell proliferation. HCT116 and HEK293T cells were infected with viruses expressing either one of two different shRNAs that targeted Stau1 or a non-targeted (NT) shRNA. Western blot analyses indicated that the efficacy of Stau1 knock-down was constant throughout the experiments (data not shown). In these conditions, both infected NT- and Stau1-KD-cells had significantly the same growth rate and numbers of colonies (data not shown) indicating that Stau1 expression is not essential for cell proliferation in transformed cell lines.

Stau1⁵⁵-FLAG3 expression does not induce cell death or cell cycle exit

To determine if the observed decrease in the number of proliferative cells is a consequence of cell death caused by Stau1⁵⁵-FLAG3 expression, we first looked for signs of apoptotic cells at day four post-infection when cells showed impaired proliferation. Apoptosis was analyzed using anti-PARP1 antibody since, in apoptotic cells, PARP1 is cleaved to generate a degradation product of 89 kDa. In these conditions, there was no sign of PARP1 cleavage (supplementary figure 2A), indicating that apoptotic cells are not present in the cultures of Stau1⁵⁵-FLAG3-expressing cells. Similarly, at day 4 post-infection, the number of quiescent or senescent cells in the Stau1⁵⁵-FLAG3- and Stau1 Δ 2-FLAG3-expressing cultures was not significantly different from that observed in the control cells (supplementary figure 2B,C).

Microarray analyses of mitotic Stau1⁵⁵-bound mRNAs

Our results argue for an important regulation of Stau1 levels during the G2 and/or M phases of the cell cycle. As a major post-transcriptional regulator, Stau1 may exert its role(s) through the spatial and/or temporal regulation of its bound mRNAs. Therefore, to gather clues

to support this possibility, we first determined if Stau1⁵⁵-FLAG expression significantly modified the transcriptome of transformed cells in prometaphase explaining the observed impairment in mitosis transit and/or cell proliferation. To this end, we transfected HEK293T cells with plasmids coding for Stau1⁵⁵-FLAG or the empty vector, synchronized the cells in prometaphase and compared the level of expression of mRNAs in these cells. As seen in Fig. 7A, the level of the FLAG protein was less than that of the endogenous Stau1. Using microarray hybridization, we showed that only 4 probes were up- or down-regulated more than 2-fold (p-value < 0.05) in Stau1⁵⁵-FLAG-transfected cells as compared to vector-transfected cells (Fig. 7B and Tables S1-S2). Our data indicate that the transcriptome of the cells in prometaphase is not largely modified by Stau1⁵⁵-FLAG expression. This is consistent with a recent transcriptome study that concludes that varying Stau1 intracellular concentration has an extremely subtle effect on mRNA levels (10).

Second, we identified Stau1-bound mRNAs in prometaphase as a means to identify mRNAs that could be modulated in response to Stau1 differential expression. Using cell extracts prepared from Stau1- and vector-transfected cells as controls, Stau1⁵⁵-FLAG was immunoprecipitated using anti-FLAG antibody. Stau1⁵⁵-FLAG-bound mRNAs were purified and used to hybridize human microarrays. A total of 275 transcripts were enriched at least 2.5-fold in immune-complexes isolated from Stau1⁵⁵-FLAG-expressing cells as compared to those isolated from vector-transfected cells (Fig. 7B and Tables S3-S4), 91 of which containing inverted Alu sequences in their 3'UTR. When each probe was assigned to a GO term, the most frequent terms were related to metabolic processes, transcription and signaling (Fig. 7C and Table S5). Interestingly, 8% of the probes coded for proteins involved in cell cycle. Accordingly, when analyzed with the Genetic Association Database program, 19 and 14 of the Stau1-bound mRNAs were linked to metabolic diseases and cancer, respectively (Fig. 7D). When analyzed with the DAVID functional annotation tool (42) to assign cellular functions to mRNAs that were enriched in Stau1⁵⁵-containing RNPs, the most prevalent terms were related to zinc finger domain and p53 signaling pathway (Tables S6, S7).

To complement the microarray data, we further studied 6 transcripts based on the role of their encoding protein in the cell cycle. These RNAs were enriched at least 2-fold in Stau1-containing complexes as compared to controls in prometaphase (Table S4) or asynchronous

(22) cells. Their expression and their association with endogenous Stau1 in prometaphase versus asynchronous HEK293T cells was studied. First, Stau1-bound mRNAs were co-immunoprecipitated from nocodazole-arrested cells using anti-Stau1 antibody and anti-HA antibody as control (Fig. 8A). Quantification of mRNA amounts in the immunoprecipitates was performed by RT-qPCR. A ratio between the amount of mRNAs in Stau1-IPs and control-IPs was calculated. The resulting ratios were then normalized over that of RPL22 mRNA, an abundant transcript not associated with Stau1 according to the microarray data. Five of the six studied mRNAs showed an increase of at least 2-fold in the Stau1-IP/control-IPs ratios as compared to that of RPL22 (Fig. 8B), confirming the microarray results. In addition, all 6 mRNAs were enriched between 2.2 and 13.5 times in Stau1-IP complexes as compared to total RNA extracts (input). Then, we compared the amount of Stau1-bound mRNAs in prometaphase cells to that in asynchronous cells. Our data showed an increase of each mRNA in Stau1-containing complexes purified from nocodazole-treated versus asynchronous cells (Fig. 8C). This increase was not simply due to enhanced steady state levels of these mRNAs in total cell extracts of nocodazole-treated cells as compared to asynchronous cells. Indeed, our data indicated that the expression of the 6 genes was quite similar in both cell conditions (Fig. 8D), except for JUB mRNA that showed a significant 1.38-fold increase in the ratio on mRNAs in prometaphase vs asynchronous cells as compared to that of RPL22.

2.1.6. Discussion

The periodic expression of cell cycle regulatory proteins is a consequence of their controlled synthesis coupled to their targeted proteolysis. It is well established that transcription factors and ubiquitin ligases play predominant roles in this event (26-28). Although post-transcriptional regulation contributes to the fine tuning of gene expression (1), the involvement of RNA-binding proteins in the control of cell cycle progression is less appreciated. In this paper, we show that the levels of the multifunctional RNA-binding protein Stau1 fluctuate during the cell cycle and describe a novel mechanism by which Cdh1 and Cdc20, two co-activators of APC/C, control Stau1 abundance. The relevance of this phenomenon during the cell cycle is illustrated by the observation that overexpression of Stau1 affects mitosis entry and impairs cell proliferation. These results raise the interesting possibilities that Stau1 is an important post-transcriptional regulator of genes involved in cell cycle progression and that APC/CCdh1 and APC/CCdc20 control the fate of relevant mRNAs via the modulation of Stau1 levels.

The APC/C co-activators Cdh1 and Cdc20 are major regulators of Stau1 stability

As expected from the pattern of Stau1 cell cycle-dependent decay that mirrors the period of activity of APC/C, we show that this enzymatic complex is involved in Stau1 degradation. It is likely that its activity on Stau1 is mediated by Cdh1 and Cdc20 since their overexpression leads to a decrease of Stau1 abundance and since Cdc20 down-regulation stabilizes Stau1 levels in mitosis. Moreover, a functional domain was identified in the N-terminus of Stau1 that allows Stau1 to interact with Cdh1 and Cdc20. All these results, combined with the observation that Stau1 is degraded by the UPS, strongly support the idea that Stau1 is a target of the E3 ubiquitin ligase APC/C.

In contrast to several APC/C targets, only a partial degradation of Stau1 was observed following mitosis exit even if APC/C-Cdh1 activity persists in early G1 (34,43-47). This partial down-regulation of Stau1 was also observed in a high throughput analysis that reported a twofold reduction of Stau1 protein level in G1 cells as compared to that in prometaphase-arrested cells (48). These results suggest that a subpopulation of Stau1 is protected from Cdh1-dependent destabilization. Since phosphorylation of some of the APC/C-Cdh1 substrates was

shown to prevent their degradation (49-52), a similar mechanism may limit the accessibility of APC/C to Stau1. Alternatively, a differential subcellular distribution of a fraction of Stau1 could prevent its decay. Since Stau1 is a multifunctional protein, its partial and/or spatial degradation may contribute to shut-down one or some of its functions no longer required or deleterious for cell cycle progression while allowing it to execute other tasks important for different cell processes. Our results suggest that the Stau1 sub-population that is degraded in mitosis is associated with mRNAs coding for cell cycle-related proteins since these transcripts are more abundant in Stau1-immunoprecipitates prepared from prometaphase cells than those from asynchronous cells (figure 8C).

The Stau1 N-terminal region impairs cell cycle progression

APC/C-dependent substrate degradation usually relies on the presence of a D-box or KEN-box recognition motif. Our results indicate that the putative D-box motif found at the C-terminus of Stau1 is not required for Cdh1 and Cdc20 binding or for Stau1 degradation (Fig. 4), suggesting that a non-classical motif may play a similar role. This motif lies within the first N-terminal 88 amino acids of Stau1. No known APC/C recognition motif is predicted in this region. Strangely, although this protein is not degraded in mitosis, its expression has no effect on cell proliferation. It is rather the expression of the full length protein that delays mitosis entry and reduces cell proliferation. It is likely that, in addition to its role in APC/C association, the N-terminus of wild type Stau1⁵⁵ plays additional roles related to inhibition of cell proliferation. Identification of the precise Cdh1/Cdc20-binding site and mutation of the motif by point mutations will be necessary to specifically address the relevance of Stau1 degradation in mitosis. It is still unknown if all these phenotypes (Cdh1 binding, Cdc20 binding, impairment of mitosis entry and inhibition of cell cycle progression) are carried out by a unique motif or if they require multiple determinants. The molecular function of the N-terminal domain is still unclear. Although its sequence is similar to the consensus sequence of the C-terminal half of a double-stranded RNA-binding domain, no RNA-binding activity was associated to it (8). In *Drosophila*, the homologous domain was shown to be involved in mRNA transport/localization (53). In mammals, such a role for this domain has not been documented so far. Indeed, previous studies excluded this region from being involved in RNA binding (7,8), translation (3), nuclear import (54), sub-cellular localization (25,54), and UPF1

association for SMD (6). All these functions were mapped to regions located outside the N-terminus of Stau1. Nevertheless, although Stau1 dimerization was shown to mainly involve dsRBD3 and dsRBD5 (55,56), a weak contribution of dsRBD2 was also reported (55). In addition, the N-terminus of Stau1 was shown to promote Pr⁵⁵Gag-Pr⁵⁵Gag interaction in the course of HIV-1 assembly (41). However, none of these studies were done during mitosis. We do not exclude the possibility that, as cells divide, the N-terminal region of Stau1 may be tagged for example by post-translational modifications and/or be associated with specific cofactors to modulate one or several activities of the protein.

Biological relevance of Stau1 regulation for cell cycle progression and post-transcriptional regulation

Our results indicate that Stau1 level during the cell cycle is reminiscent of that of other APC/C substrates. As most of them play important roles in mitosis (57), it was consistent to observe that fluctuation of Stau1 level impairs mitosis. Indeed, effects on mitosis were described following overexpression of other APC/C substrates like the Polo-like kinase 1 (Plk1) and the mitotic spindle-associated proteins TMAP/CKAP2 and NuSAP (58-61). In these cases, impaired cytokinesis and structural defects in the mitotic spindle were shown to be the major factors for mitosis delay or cell cycle arrest. Therefore, one interpretation of our results is that Stau1 has mitotic functions that must eventually be inhibited for proper progression through mitosis.

In addition to mitosis, Stau1⁵⁵-FLAG3 expression also impaired cell proliferation. Our results are in agreement with those of a large-scale screen in which Stau1 significantly inhibited colony formation when transfected in human hepatoma cells (62). It is possible that cell proliferation impairment associated with Stau1 overexpression is a result of the accumulation of the observed mitotic delay over multiple rounds of cell division. For example, it was shown that a partial disassembly of the mitotic apparatus did not affect the current division but prevented the formation of a functional spindle during the next mitosis (63). Similarly, a slight overexpression of a non-degradable form of the cytoskeleton-associated protein 2 (CKAP2), a target of APC/C, does not prevent the cell to go through the process of cell division. However, abnormalities in spindle assembly appear during the subsequent mitosis (58). Although it is not known whether Stau1 participates in spindle functions, this

possibility would be consistent with the fact that Stau1⁵⁵-FLAG3 expression causes a relatively weak delay in mitosis and a stronger impairment of cell proliferation. Nevertheless, we do not exclude the possibility that these two phenotypes involve different mechanisms and/or perturb different phases of the cell cycle. Although the mechanism is not yet defined, our studies excluded apoptosis, senescence and quiescence as major factors for the observed decreased cell proliferation.

Strikingly, the phenotypes due to Stau1 overexpression are observed in three cancer cell lines but not in two untransformed cells. Although it may be too early to generalize to all cancers and untransformed cells, our data suggest that Stau1 may restore, at least partly, some pathways that had been modified and/or overcome to allow unregulated proliferation of cancer cells. Based on the fact that Stau1⁵⁵-FLAG3 expression restrains mitosis entry, Stau1 may be somehow involved in mechanisms that lead to checkpoint decisions in G2 and/or at the G2/M transition. Such a major role for Stau1 during the G2 and G2/M phases of the cell cycle is also consistent with its pattern of expression through the cell cycle which reveals a peak of expression during this time period (see also below). Thus, its overexpression in transformed cells could result in the reinforcement of the mechanisms of checkpoint regulation that are often lost in genetically unstable cancer cells. If involved in mechanisms of regulation, it is not unexpected that Stau1 down-regulation has no effect on proliferation of cancer cells that have modified and optimized each pathway for unregulated cell division.

Stau1-bound mRNAs isolated in prometaphase partly overlap those in asynchronous cells. Although comparisons are sometimes hard to interpret since experiments from different laboratories were done and analyzed by different techniques, almost half of the genes found in this study as Stau1 targets in prometaphase had previously been reported in other independent studies (10,11,22), confirming the specificity of our approach. The other half of the transcripts may be prometaphase-enriched targets since all other studies were done in asynchronous cells. It would be consistent with data in figure 8C that shows that specific Stau1-bound mRNAs are more abundant in the Stau1-immunoprecipitates from cells in prometaphase than in asynchronous cells. Interestingly, 33% of the Stau1-bound mRNAs in prometaphase cells contain opposite-polarity Alu elements in the 3'UTR, a percentage that is quite similar to those reported in interphase cells (10,11).

Stau1 is a multifunctional protein involved in the post-transcriptional regulation of gene expression including mRNA transport, translation, decay, nuclear export and splicing. It is thus difficult to predict its precise involvement in the processes of cell division. However, based on recent studies (10,11,13), specific hypotheses can be proposed. It was shown that overexpression of transfected Stau1 increases ribosome occupancy and thus translation of bound mRNAs (10,11). In our study, we demonstrate that the amount of endogenous Stau1 is at least 2-fold higher in the G2 phase of the cell cycle than in G1, suggesting that Stau1-bound mRNAs may be translated more efficiently during G2 than G1. As Stau1 binds many mRNAs coding for zinc-finger proteins involved in transcriptional and post-transcriptional mechanisms (Supplementary Tables S6, S7), the temporal increase expression of Stau1 would trigger a cascade that is progressively amplified through post-transcriptional and transcriptional effects that will ultimately modify the expression of multiple genes. Its subsequent degradation by the APC/C would silence these mRNAs whose expression may no longer be required as cells exit mitosis.

However, not all Stau1-bound mRNAs are subjected to enhanced translation upon Stau1 overexpression (10). Therefore, Stau1 may play a different role on these mRNAs. Several studies have shown that specific mRNAs are localized on the mitotic spindles in *Drosophila*, *Xenopus* and the human HeLa cell line (64-67). It is noteworthy that 6% of the Stau1-bound mRNAs in prometaphase cells are among those that are enriched on the mitotic spindle of human cells (65). Thus, one attractive possibility is that Stau1 participates in the localization, sequestration and/or anchoring of these mRNAs on the mitotic apparatus. This mechanism may ensure that both daughter cells receive equal amounts of these transcripts after cell division. The presence of a tubulin-binding domain in Stau1 protein and its involvement in the microtubule-dependent transport of mRNAs in neurons are consistent with this hypothesis (4,5,8). Through this mechanism, Stau1 could control a second mRNA regulon and its degradation in mitosis may trigger the release of its bound mRNAs and allow their timely translation for proper progression through the cell cycle.

Through the cell cycle-dependent proteolysis of numerous substrates, APC/C is required for cell survival and proliferation. The list of its known targets not only includes important cell cycle regulators such as cyclins, mitotic kinases and organizers of the

cytoskeleton, but also modulators of gene expression like transcription factors and components of E3 ubiquitin ligases complexes (45,68-72). In Arabidopsis, APC/C also targets DRB4 (dsRNA-binding protein 4) a protein involved in RNA silencing (73). Our results with Stau1 add an RNA-binding protein to this growing list of APC/C effectors in mammals, suggesting that post-transcriptional mechanisms are also subject to APC/C control.

2.1.7. Acknowledgment

We thank Louise Cournoyer for help in the cell culture experiments, Xavier H. Mascle for sharing preliminary results, Natasha Dozois, Maude Martin and Eric Zampini for help in some experiments. We also thank Dr Gerardo Ferbeyre for sharing materials and Dr Michele Pagano, Dr Michel Bouvier and Dr Reuven Agami for providing plasmids.

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) [41596-04 to LDG]. VT and KB were supported by studentships from NSERC and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), respectively.

2.1.8. References

1. Keene, J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature reviews*, 8, 533-543.
2. Moore, M.J. (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science (New York, N.Y)*, 309, 1514-1518.
3. Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A.J. and DesGroseillers, L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic acids research*, 33, 4797-4812.
4. Kanai, Y., Dohmae, N. and Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43, 513-525.
5. Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J. and Dotti, C.G. (1999) The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci*, 19, 288-297.
6. Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L. and Maquat, L.E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*, 120, 195-208.
7. Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. and Ortin, J. (1999) A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*, 19, 2212-2219.
8. 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. *Molecular and cellular biology*, 19, 2220-2230.
9. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16374-16379.

10. 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.

11. de Lucas, S., Oliveros, J.C., Chagoyen, M. and Ortin, J. (2014) Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic acids research*, 42, 4516-4526.

12. Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L. and Maquat, L.E. (2007) Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal*, 26, 2670-2681.

13. 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 & development*, 27, 1495-1510.

14. Ravel-Chapuis, A., Belanger, G., Yadava, R.S., Mahadevan, M.S., DesGroseillers, L., Cote, J. and Jasmin, B.J. (2012) The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology*, 196, 699-712.

15. 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. *Journal of neurochemistry*, 86, 669-677.

16. Gautrey, H., McConnell, J., Lako, M., Hall, J. and Hesketh, J. (2008) Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta*, 1783, 1935-1942.

17. Yamaguchi, Y., Oohinata, R., Naiki, T. and Irie, K. (2008) Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells*, 13, 583-592.

18. 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 & development*, 23, 54-66.
19. Kretz, M. (2013) TINCR, stau1, and cellular differentiation. *RNA biology*, 10.
20. Cho, H., Kim, K.M., Han, S., Choe, J., Park, S.G., Choi, S.S. and Kim, Y.K. (2012) Stau1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Molecular cell*, 46, 495-506.
21. Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C.E., Sossin, W., Desgroseillers, L. and Lacaille, J.C. (2008) Stau1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Molecular and cellular biology*, 28, 2896-2907.
22. Furic, L., Maher-Laporte, M. and DesGroseillers, L. (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Stau1- and Stau2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, N.Y.)*, 14, 324-335.
23. 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 Stau1-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic acids research*, 41, 9438-9460.
24. LeGendre, J.B., Campbell, Z.T., Kroll-Conner, P., Anderson, P., Kimble, J. and Wickens, M. (2013) RNA targets and specificity of Stau1, a double-stranded RNA-binding protein in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*, 288, 2532-2545.
25. Luo, M., Duchaine, T.F. and DesGroseillers, L. (2002) Molecular mapping of the determinants involved in human Stau1-ribosome association. *The Biochemical journal*, 365, 817-824.
26. Tyson, J.J., Csikasz-Nagy, A. and Novak, B. (2002) The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays*, 24, 1095-1109.

27. Tyson, J.J. and Novak, B. (2008) Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol*, 18, R759-R768.
28. Reed, S.I. (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 855-864.
29. Nakayama, K.I. and Nakayama, K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 369-381.
30. Pesin, J.A. and Orr-Weaver, T.L. (2008) Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 475-499.
31. Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349, 132-138.
32. Burton, J.L., Tsakraklides, V. and Solomon, M.J. (2005) Assembly of an APC-Cdh1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box. *Molecular cell*, 18, 533-542.
33. Pflieger, C.M. and Kirschner, M.W. (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & development*, 14, 655-665.
34. Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D. and Pagano, M. (2004) Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature*, 428, 190-193.
35. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P.G., Aubry, M. and Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nature methods*, 1, 203-208.
36. 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. *Journal of cell science*, 123, 369-383.
37. Harper, J.V. (2005) Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle. *Methods Mol Biol*, 296, 157-166.

38. Vassilev, L.T. (2006) Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell cycle* (Georgetown, Tex, 5, 2555-2556.
39. 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 & development*, 14, 2015-2027.
40. Ren, S. and Rollins, B.J. (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117, 239-251.
41. Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J. and Desgroseillers, L. (2008) The host protein Stauf1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology*, 5, 41.
42. Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. and Lempicki, R.A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology*, 4, P3.
43. Sigl, R., Wandke, C., Rauch, V., Kirk, J., Hunt, T. and Geley, S. (2009) Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *Journal of cell science*, 122, 4208-4217.
44. Wei, W., Ayad, N.G., Wan, Y., Zhang, G.J., Kirschner, M.W. and Kaelin, W.G., Jr. (2004) Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*, 428, 194-198.
45. Park, H.J., Costa, R.H., Lau, L.F., Tyner, A.L. and Raychaudhuri, P. (2008) Anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated proteolysis of the forkhead box M1 transcription factor is critical for regulated entry into S phase. *Molecular and cellular biology*, 28, 5162-5171.
46. Almeida, A., Bolanos, J.P. and Moreno, S. (2005) Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci*, 25, 8115-8121.
47. Engelbert, D., Schnerch, D., Baumgarten, A. and Wasch, R. (2008) The ubiquitin ligase APC(Cdh1) is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene*, 27, 907-917.

48. Dephore, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J. and Gygi, S.P. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10762-10767.
49. Gao, D., Inuzuka, H., Tseng, A., Chin, R.Y., Toker, A. and Wei, W. (2009) Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCdh1-mediated Skp2 destruction. *Nature cell biology*, 11, 397-408.
50. Rodier, G., Coulombe, P., Tanguay, P.L., Boutonnet, C. and Meloche, S. (2008) Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *The EMBO journal*, 27, 679-691.
51. Mailand, N. and Diffley, J.F. (2005) CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell*, 122, 915-926.
52. Littlepage, L.E. and Ruderman, J.V. (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes & development*, 16, 2274-2285.
53. 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. *The EMBO journal*, 19, 1366-1377.
54. Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M.A. and Desgroseillers, L. (2006) Stauf1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *The Biochemical journal*, 393, 245-254.
55. 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 Stauf1 in live cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 16, 585-597.
56. Park, E., Gleghorn, M.L. and Maquat, L.E. (2013) Stauf2 functions in Stauf1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 405-412.

57. Manchado, E., Eguren, M. and Malumbres, M. (2010) The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochemical Society transactions*, 38, 65-71.
58. Hong, K.U., Park, Y.S., Seong, Y.S., Kang, D., Bae, C.D. and Park, J. (2007) Functional importance of the anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated degradation of TMAP/CKAP2 in regulation of spindle function and cytokinesis. *Molecular and cellular biology*, 27, 3667-3681.
59. Lindon, C. and Pines, J. (2004) Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *The Journal of cell biology*, 164, 233-241.
60. Seki, A. and Fang, G. (2007) CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-Cdh1 during mitotic exit. *The Journal of biological chemistry*, 282, 15103-15113.
61. Li, L., Zhou, Y., Sun, L., Xing, G., Tian, C., Sun, J., Zhang, L. and He, F. (2007) NuSAP is degraded by APC/C-Cdh1 and its overexpression results in mitotic arrest dependent of its microtubules' affinity. *Cellular signalling*, 19, 2046-2055.
62. Wan, D., Gong, Y., Qin, W., Zhang, P., Li, J., Wei, L., Zhou, X., Li, H., Qiu, X., Zhong, F. et al. (2004) Large-scale cDNA transfection screening for genes related to cancer development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15724-15729.
63. Woodruff, J.B., Drubin, D.G. and Barnes, G. (2012) Spindle assembly requires complete disassembly of spindle remnants from the previous cell cycle. *Molecular biology of the cell*, 23, 258-267.
64. 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.
65. Blower, M.D., Feric, E., Weis, K. and Heald, R. (2007) Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *The Journal of cell biology*, 179, 1365-1373.

66. 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.
67. Raff, J.W., Whitfield, W.G. and Glover, D.M. (1990) Two distinct mechanisms localise cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. *Development* (Cambridge, England), 110, 1249-1261.
68. Lasorella, A., Stegmuller, J., Guardavaccaro, D., Liu, G., Carro, M.S., Rothschild, G., de la Torre-Ubieta, L., Pagano, M., Bonni, A. and Iavarone, A. (2006) Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature*, 442, 471-474.
69. Gabellini, D., Colaluca, I.N., Vodermaier, H.C., Biamonti, G., Giacca, M., Falaschi, A., Riva, S. and Peverali, F.A. (2003) Early mitotic degradation of the homeoprotein HOXC10 is potentially linked to cell cycle progression. *The EMBO journal*, 22, 3715-3724.
70. Peters, J.M. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 644-656.
71. Christensen, K.L., Brennan, J.D., Aldridge, C.S. and Ford, H.L. (2007) Cell cycle regulation of the human Six1 homeoprotein is mediated by APC(Cdh1). *Oncogene*, 26, 3406-3414.
72. Laoukili, J., Alvarez-Fernandez, M., Stahl, M. and Medema, R.H. (2008) FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1-dependent manner. *Cell cycle* (Georgetown, Tex, 7, 2720-2726.
73. Marrocco, K., Criqui, M.C., Zervudacki, J., Schott, G., Eisler, H., Parnet, A., Dunoyer, P. and Genschik, P. (2012) APC/C-mediated degradation of dsRNA-binding protein 4 (DRB4) involved in RNA silencing. *PLoS ONE*, 7, e35173.

2.1.9. Figures legends

Figure 1. Stau1 protein levels vary during the cell cycle. (A) HCT116 cells were grown asynchronously (AS) or were synchronized at the G1/S transition by a double thymidine block (DTB) and then released by addition of fresh medium. Cell extracts were prepared at different time points post-release as indicated and analyzed by Western blotting (Top and middle panels). CyclinB, marker of S, G2 and M phases; AuroraA, marker of G2 and M phases; MPM2, mitosis protein monoclonal 2 detects a variety of phosphorylated proteins during mitosis. DNA content was assessed by flow cytometry analysis at the indicated time points after release from thymidine block (Bottom panel). (B) HCT116 cells blocked in prometaphase with nocodazole (NB) were collected by shake-off and replated in fresh medium. Cell extracts were prepared at different time points and analysed by Western blotting. (Bottom) RNA was isolated from the cell extracts used for Western blot analysis and the levels of mRNA were quantified by RT-qPCR. The ratios between Stau1 and GAPDH mRNA levels were calculated at each time point and the means were plotted relative to that obtained at time 0, which was arbitrarily set to 1. (C) U2OS cells were grown asynchronously (As) or were synchronized at the G1/S transition (DTB), in prometaphase (NB) or in G1 by a nocodazole block followed by a release of 3h in fresh medium (NB+3h). Stau1 levels were monitored by Western blotting. Cyclin A, marker of the G1/S transition. Western blot results (A, B, C) are representatives of three independently performed experiments that showed similar profiles. Statistical analyses: Quantification of the relative amounts of Stau1 protein and/or mRNA at each time point, expressed as the mean of 3 independent experiments. Standard deviations are shown and statistical analyses (Student's t-test) are indicated when significant. For protein analysis, the ratios between Stau1 and β -Actin levels were calculated at each time point and the means were plotted relative to that obtained at time 0 (A, B) or DTB (C), which was arbitrarily set to 1. Quantifications of cyclin B1, Aurora A and MPM2 are provided in supplementary Fig 1.

Figure 2. Stau1 is a substrate of the ubiquitin proteasome system. Untransfected HCT116, HEK293T and U2OS cells (A) and Stau1⁵⁵-FLAG-transfected HEK293T cells (B) were treated for 6 h with the proteasome inhibitor MG132 (10 μ M) or by DMSO (the MG132 vehicle) as control. Cell extracts were analyzed by Western blotting. The ratios between Stau1

and β -Actin levels and the statistical analyses were calculated as described in the legend of figure 1, the ratio observed in cells treated with DMSO being arbitrarily set to 1. (C) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA3 and/or GFP-Ubiquitin. Left: input. Right: Stau1⁵⁵-HA3 was immunoprecipitated with a mouse monoclonal anti-HA antibody (12CA5) and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting. *, unspecific signal. Each panel is representative of three independently performed experiments that generated similar results.

Figure 3. Stau1 down-regulation in mitosis is dependent on the APC/C. (A) HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-FLAG3 and HA-Cdc20, HA-Cdh1 or the empty vector as control. Cells extracts were analyzed by Western blotting. *, unspecific signal. (B) HCT116 cells were transfected with siRNAs control or targeting the Cdc20 mRNA. Cells were synchronized in late G2 with RO-3306 (0) and released from the block for 3 h (3). Cell extracts were analyzed by western blotting. In A and B, the ratios between Stau155-FLAG and β -Actin levels and the statistical analyses were calculated as in the legend of figure 1, the ratio observed in cells transfected with the empty vector being arbitrarily set to 1. (C) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for FLAG-Cdh1, FLAG-Cdc20 or FLAG-YFP as indicated. Left: Input. Right: FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and co-purified endogenous Stau1 was detected with anti-Stau1 antibody by Western blotting. Each panel (A,B,C) is representative of three independently performed experiments.

Figure 4. The N-terminal region of Stau1 is required for its down-regulation by APC/C. (A) The D-box and Stau1 Δ 2 mutated proteins are shown below the schematic representation of Stau1. dsRBD: double-stranded RNA-binding domain. TBD: tubulin-binding domain. (B) HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-FLAG3, Stau1Dmut-FLAG3 or Stau1 Δ 2-FLAG3 and HA-Cdc20, HA-Cdh1 or the empty vector as control. Cell extracts were analyzed by Western blotting. *, unspecific signal. (C) HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for HA-Cdh1 or HA-Cdc20 and FLAG-YFP, Stau1⁵⁵-FLAG, Stau1Dmut-FLAG, Stau1 Δ 2-FLAG, Cdc20-FLAG or Cdh1-FLAG, as indicated. Left: Input. Right: FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and co-purified proteins were detected with anti-HA and anti-S6 antibodies by

Western blotting. Anti-ribosomal protein S6 was used as control. Cdc20 being a known target of Cdh1, this interaction can be viewed as the positive control. Interaction with YFP is the negative control. Each panel (A,B,C) is representative of three independently performed experiments.

Figure 5. Expression of Stau1⁵⁵-FLAG3 impairs mitosis entry. (A) HCT116 cells were infected with viruses expressing Stau1⁵⁵-FLAG3 (S) or Stau1 Δ 2-FLAG3 (S Δ 2), then synchronized at the G2/M transition with RO-3306 at 10 μ M (0) and released for 3 (3) or 5 (5) h. Proteins in cell extracts were analyzed by Western blotting. (B) HCT116 cells were infected with viruses expressing Stau1⁵⁵-FLAG3, Stau1 Δ 2-FLAG3 or the empty vector (V) and Stau1 expression in asynchronous cells was analyzed by Western blotting. (C, D) HCT116 cells were infected as in B, synchronized at the G2/M phase transition with RO-3306 and then released from the block. At different time points post-release, cells were harvested and analyzed by FACS to calculate the percentage of cells in G1. A representative experiment (C) and the means of 3 independently performed experiments (D) are shown. The graph in D represents the mean and standard deviation of the ratio of the number of cells in the G1 phase at specific time post-release over that at time 0. Statistical analyses (Student's t-test) are indicated when significant. (E) Infected unsynchronized HCT116 cells were harvested, stained with Hoechst solution and analyzed by FACS to calculate the percentage of cells in the G2-M phases of the cell cycle. The statistical analysis (Student's t-test) of 3 independently performed experiments is provided. (F) Cells harvested in E were also stained with anti-phospho-histone H3 (p-H3) antibody to determine the relative amounts of mitotic cells within the G2-M population. The ratio of the percentage of p-H3 positive cells on G2-M cells is shown. The statistical analysis (Student's t-test) of 3 independently performed experiments is provided.

Figure 6. Stau1⁵⁵-FLAG3 expression impairs cell proliferation. (A) HCT116 cells were infected with viruses expressing Stau1⁵⁵-FLAG3, Stau1 Δ 2-FLAG3 or the empty vector and Stau1 overexpression was analyzed by Western blotting. (B) HCT116 infected cells were grown in the presence of puromycin for 2 days and then replated at the same density in fresh medium. Cells were harvested every day and the number of cells was counted using a hemacytometer. The graph shows the means and standard deviation of cell counts of 3 independently performed experiments. (C) HCT116 cells were plated as in (B). Colony

formation assays were performed to measure cell proliferation in cells expressing Stau155-FLAG3, Stau1 Δ 2-FLAG3 or the empty vector when grown for 10 or 14 days. Results are representative of three independently performed experiments. Colonies were stained with crystal violet. The stain was extracted and quantified by measuring absorbance at 590 nm. Quantification of the relative amounts of stain in cells transfected with the empty vector, Stau1⁵⁵-FLAG or Stau1 Δ 2-FLAG3 is expressed as the mean and standard deviation of 3 independent experiments, absorbance of cells infected with the empty vector being arbitrarily fixed to 1. The statistical analysis (Student's t-test) is provided. V, empty vector; S, Stau155-FLAG3; S Δ 2, Stau1 Δ 2-FLAG3. (D) Transformed cell lines (U2OS and HEK293T) and (E) untransformed cell lines (IMR90 and htert-RPE1) were infected with viruses expressing the empty vector (V) or Stau155-FLAG3 or Stau1⁵⁵-HA3 (S) as indicated and plated at the same density for the colony formation assay. Left: Western blot analyses of cells infected with the indicated viruses. Middle: Representative data of three independently performed experiments. Right: Quantification of crystal violet stained cells as described above.

Figure 7. Microarray analyses of Stau1-transfected HEK293T cells in prometaphase. (A) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for the empty vector or Stau1⁵⁵-FLAG and then synchronized with nocodazole. Prometaphase cells were collected and protein levels were monitored by Western blotting (input). Cell extracts were also used to immunoprecipitate Stau1⁵⁵-FLAG and its bound mRNAs. Proteins were analyzed by Western blotting as above (After IP). (B) Total RNA and RNAs isolated in Stau1⁵⁵-FLAG immune complexes of prometaphase cells were used to hybridize microarrays (n = 3). Scatter plots (as a means to investigate a possible relationship between 2 sets of data) are shown. (C) Stau155-FLAG-bound mRNAs were identified by microarray hybridization (n = 3) and grouped according to the gene ontology database. (D) Stau1⁵⁵-FLAG-bound mRNAs were analyzed with the Genetic Association Database program to identify those that are associated with diseases.

Figure 8. RT-qPCR validation of microarray data using selected mRNAs. (A) HEK293T cells were left asynchronous (As) or synchronized in prometaphase with nocodazole (Noc) (Input). Endogenous Stau1-containing mRNPs were immunopurified using anti-Stau1 antibody (After IP). Anti-HA antibody was used as control. Proteins were

visualized by Western blotting. (B) Endogenous Stau1-containing mRNPs were immunopurified from nocodazole-treated cells using anti-Stau1 antibody. Anti-HA antibody was used as control. Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated and RT-qPCR amplified with specific primers. The ratios of gene expression for each transcript in Stau1-IP versus control-IP were normalized to that of RPL22 used as control. (C) Endogenous Stau1-containing mRNPs were immunopurified from asynchronous and nocodazole-treated cells as in B. Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated and RT-qPCR amplified with specific primers. The ratios of gene expression for each transcript in Stau1-IP versus control-IP normalized to that of RPL22 were calculated in asynchronous (As) and prometaphase (Noc) cells. The ratio in asynchronous cells was arbitrary fixed at 1. (D) Total mRNA was isolated from asynchronous and nocodazole-treated cells and the expression of the 6 transcripts was quantified by RT-qPCR. The ratios of gene expression in nocodazole-treated cells versus asynchronous cells were normalized to that of RPL22. Each panel (B,C,D) represents the means and standard deviations of 3 independently performed experiments. The statistical analysis (Student's t-test) is provided. RPL = RPL22, ribosomal protein L22; APAF1, apoptotic peptidase activating factor 1; RB1, retinoblastoma 1; SPC24, NDC80 kinetochore complex component; Jub, ajuba homolog; MOB = MOBKL2B, Mps One Binder kinase activator-like 2B; VHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor.

2.1.10. Figures

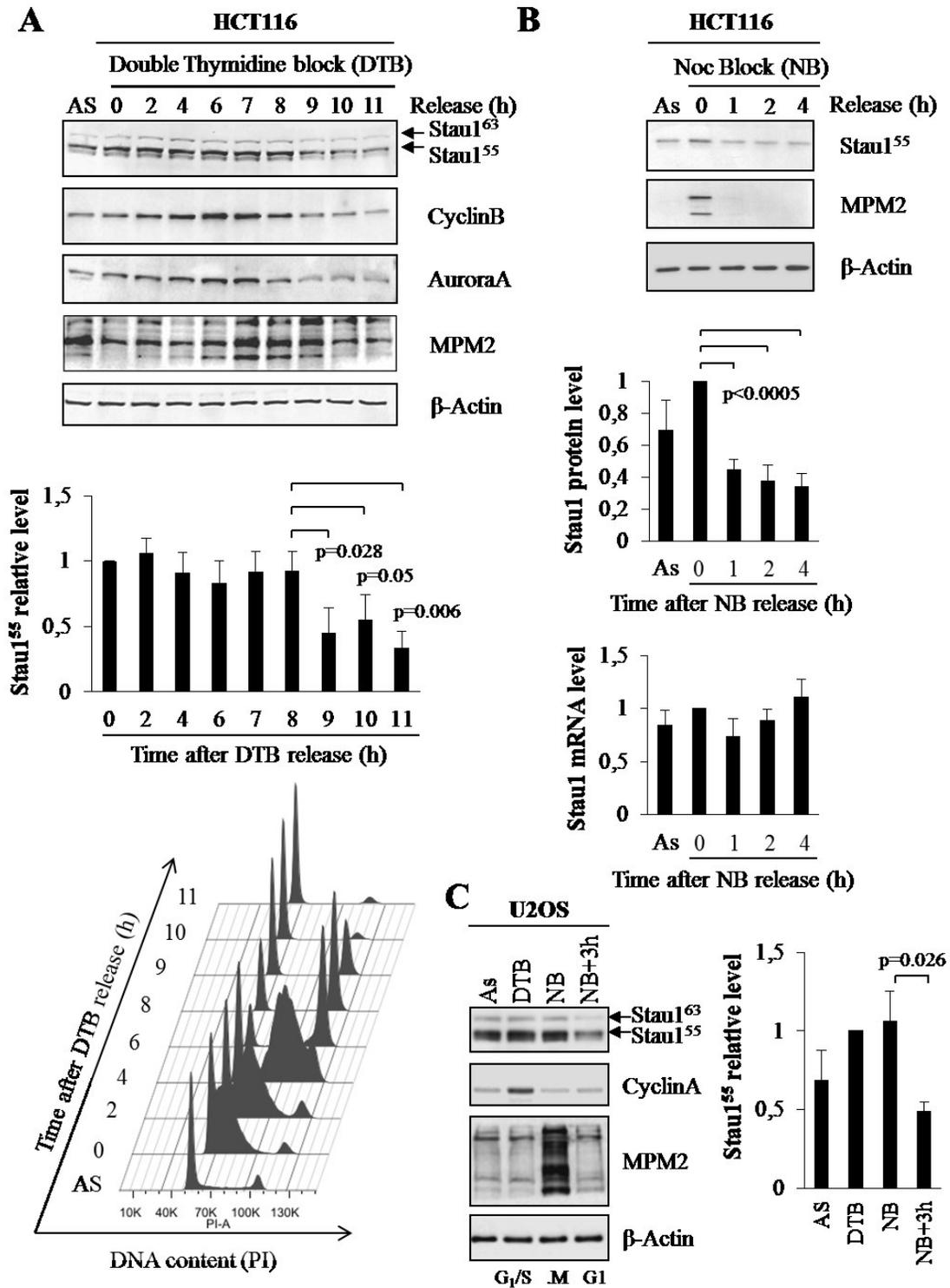


Figure 1

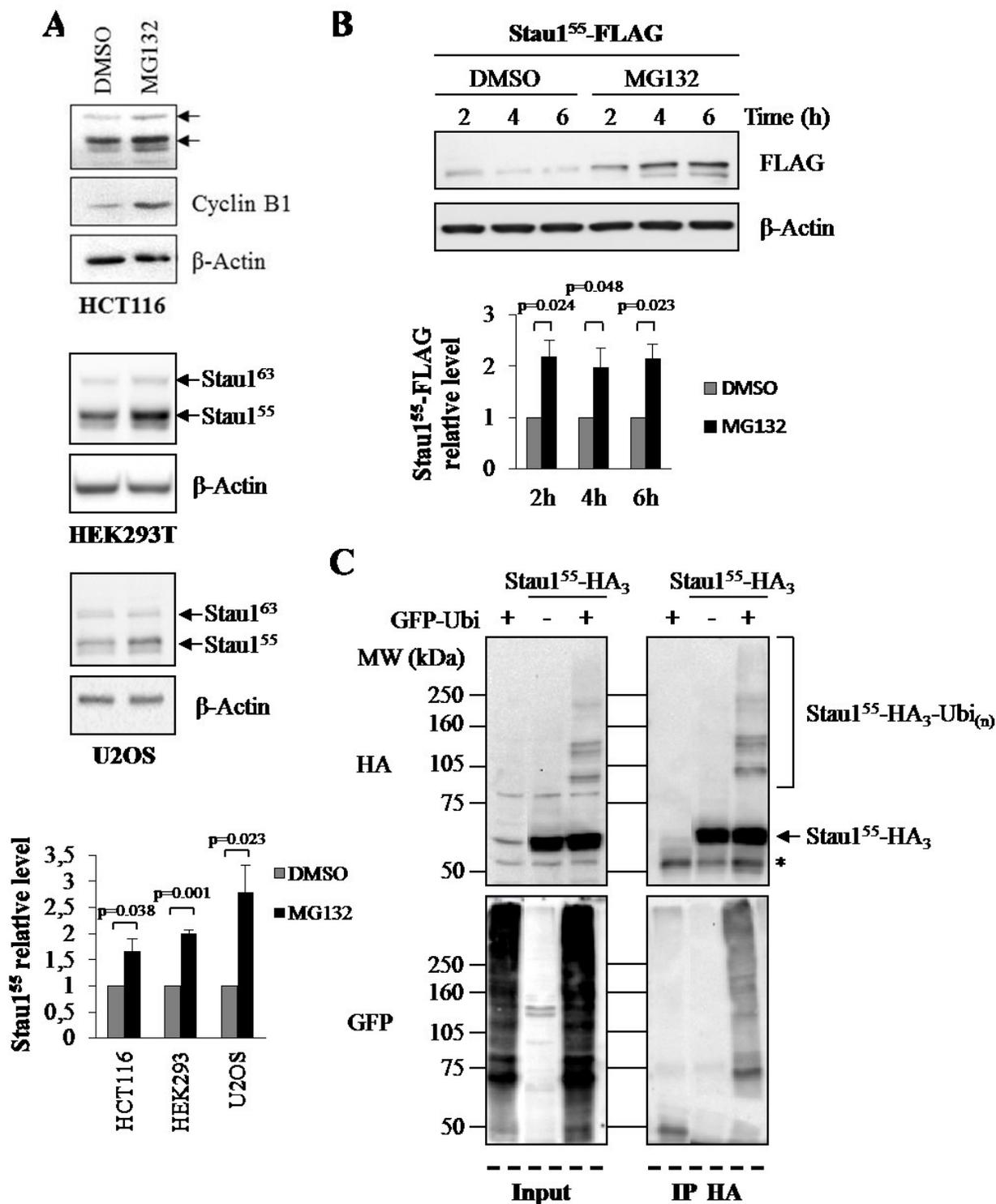


Figure 2

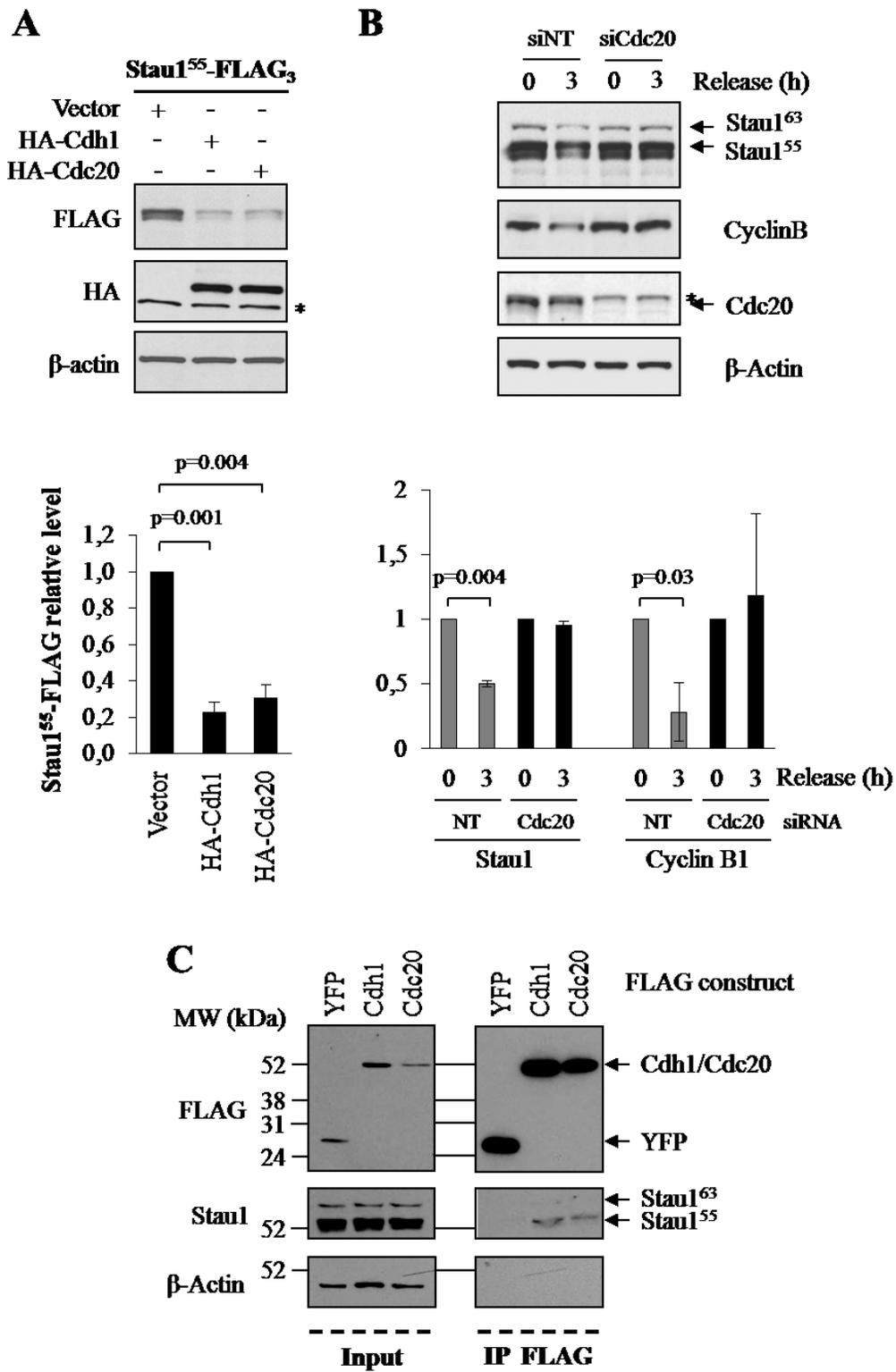
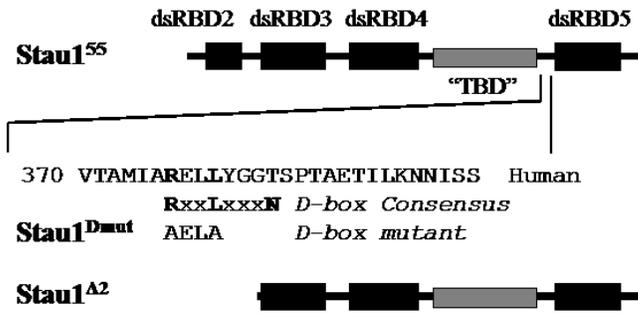
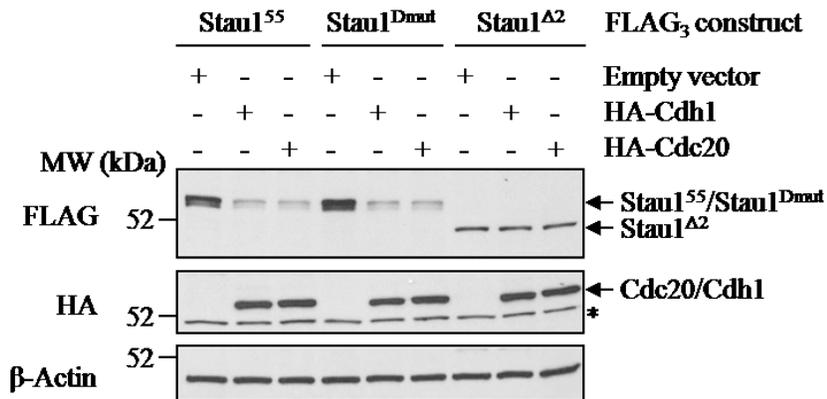


Figure 3

A



B



C

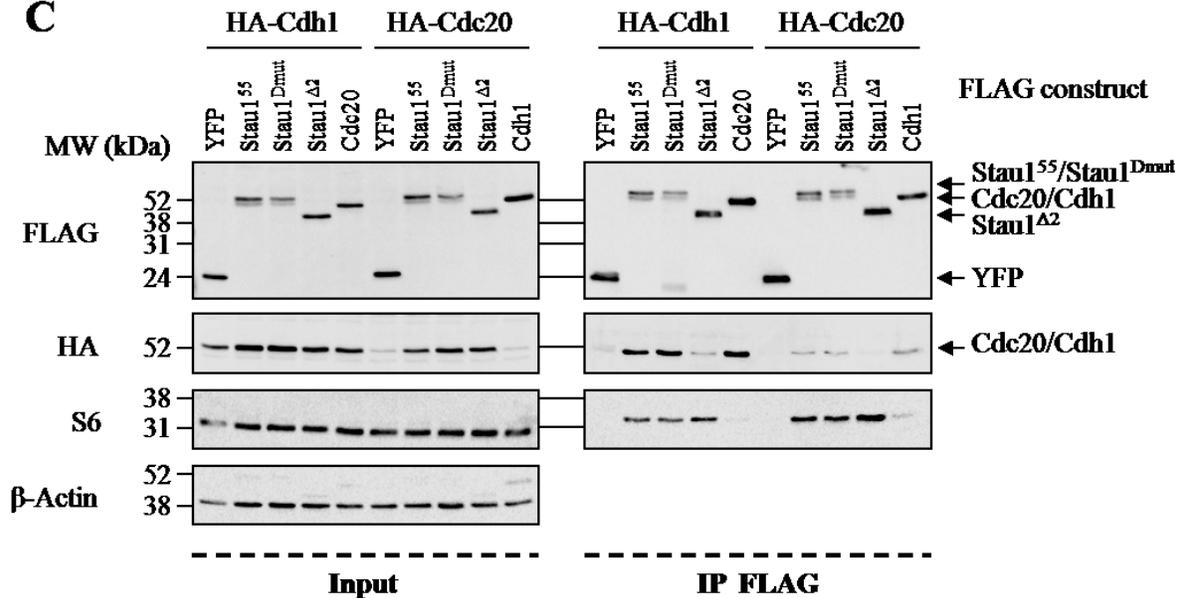


Figure 4

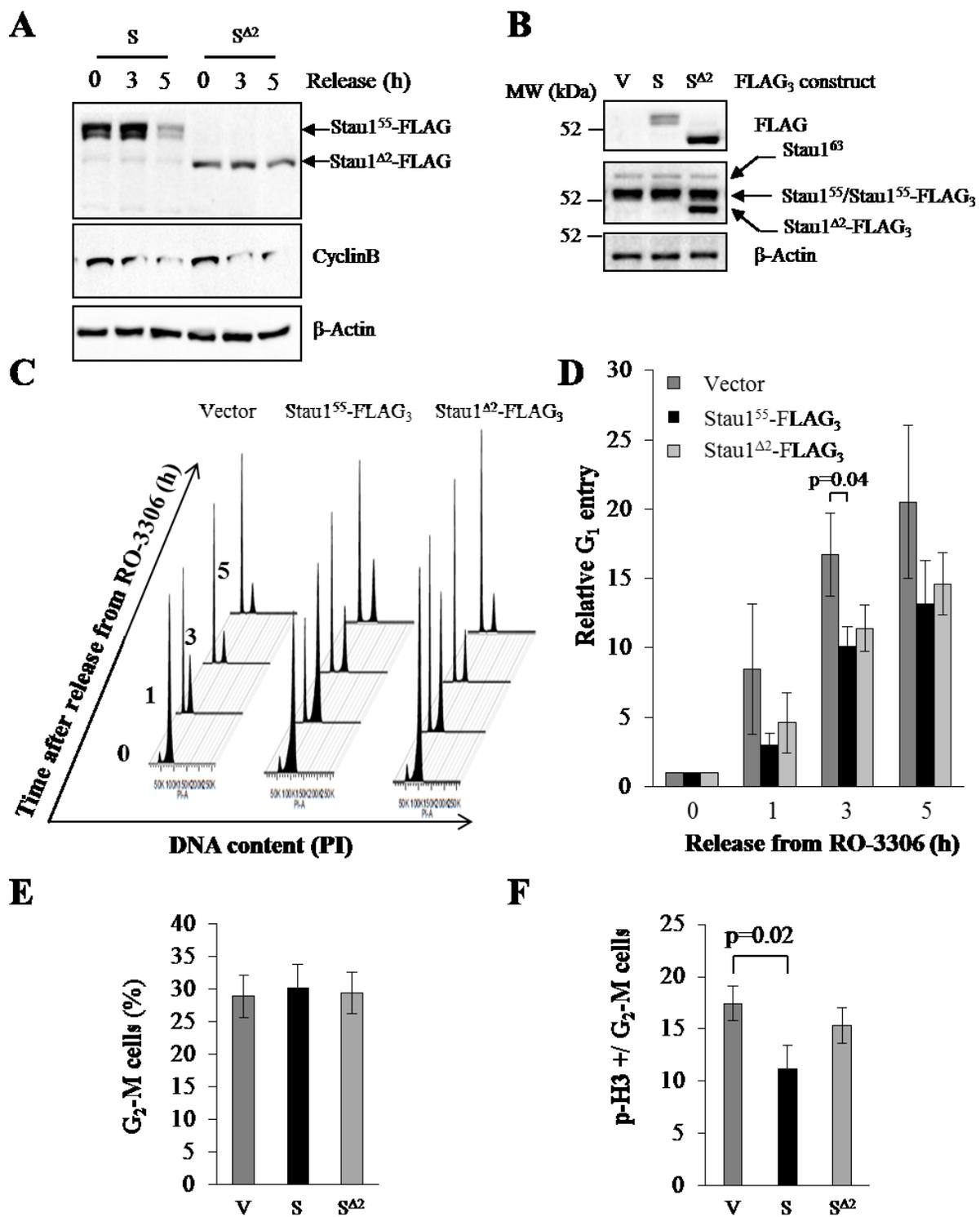


Figure 5

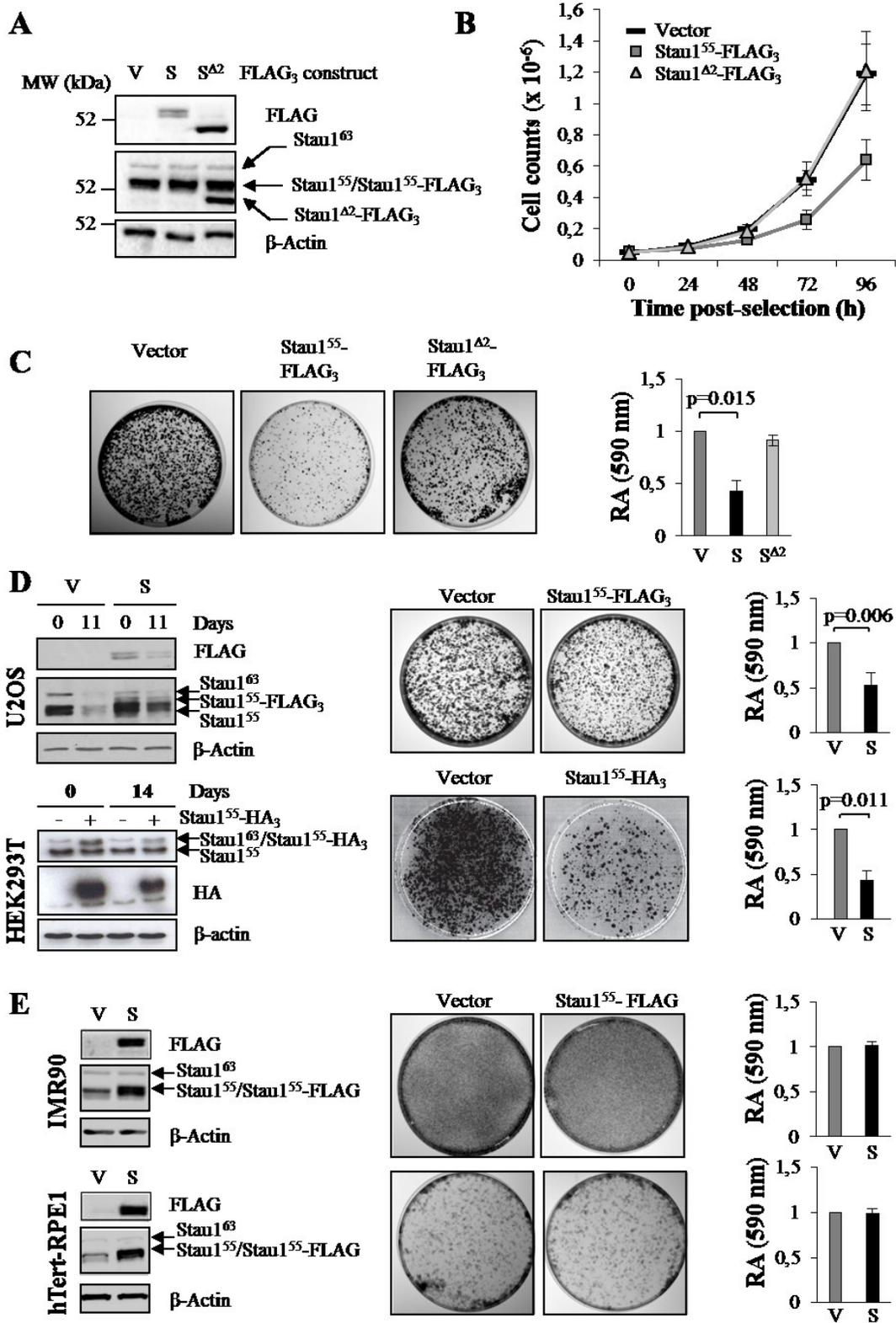


Figure 6

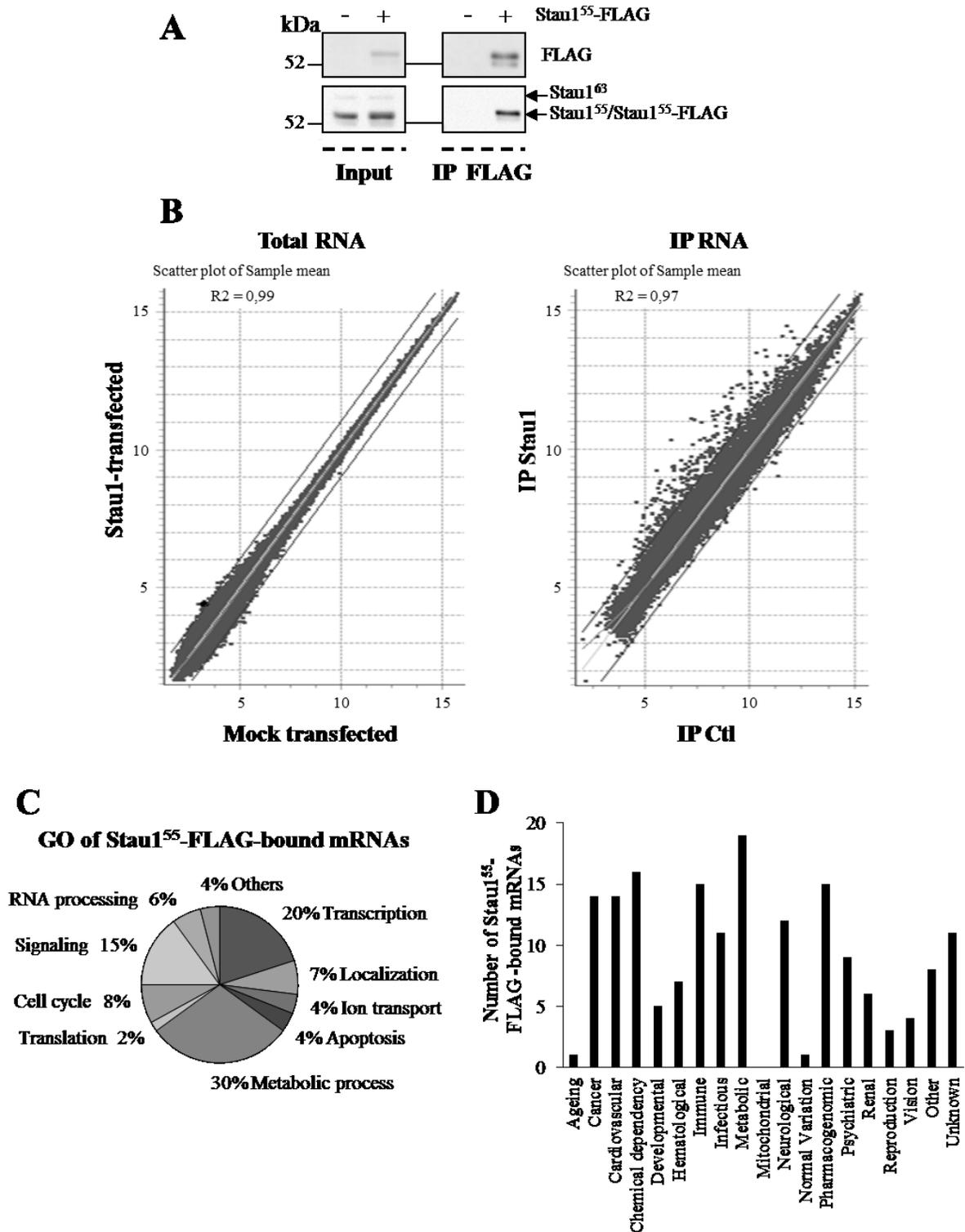


Figure 7

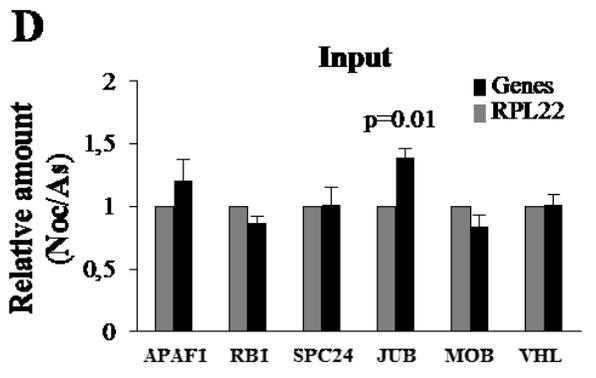
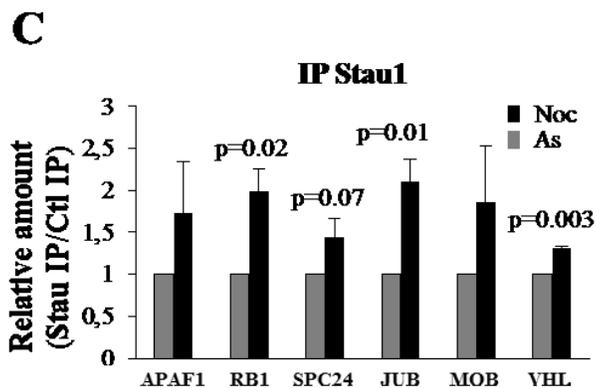
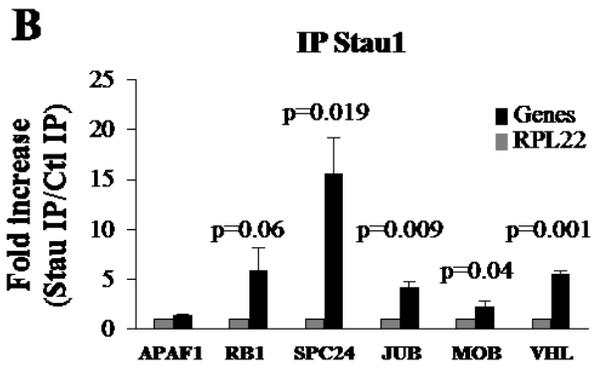
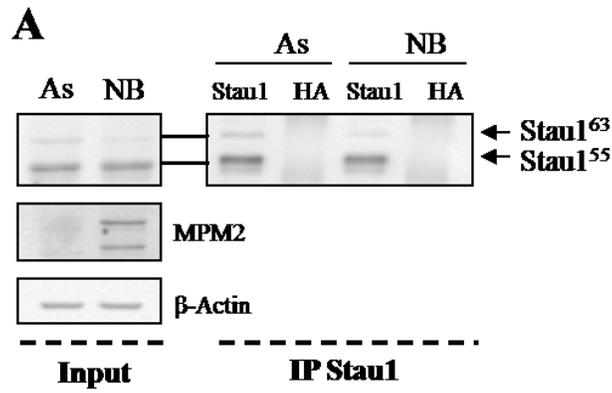


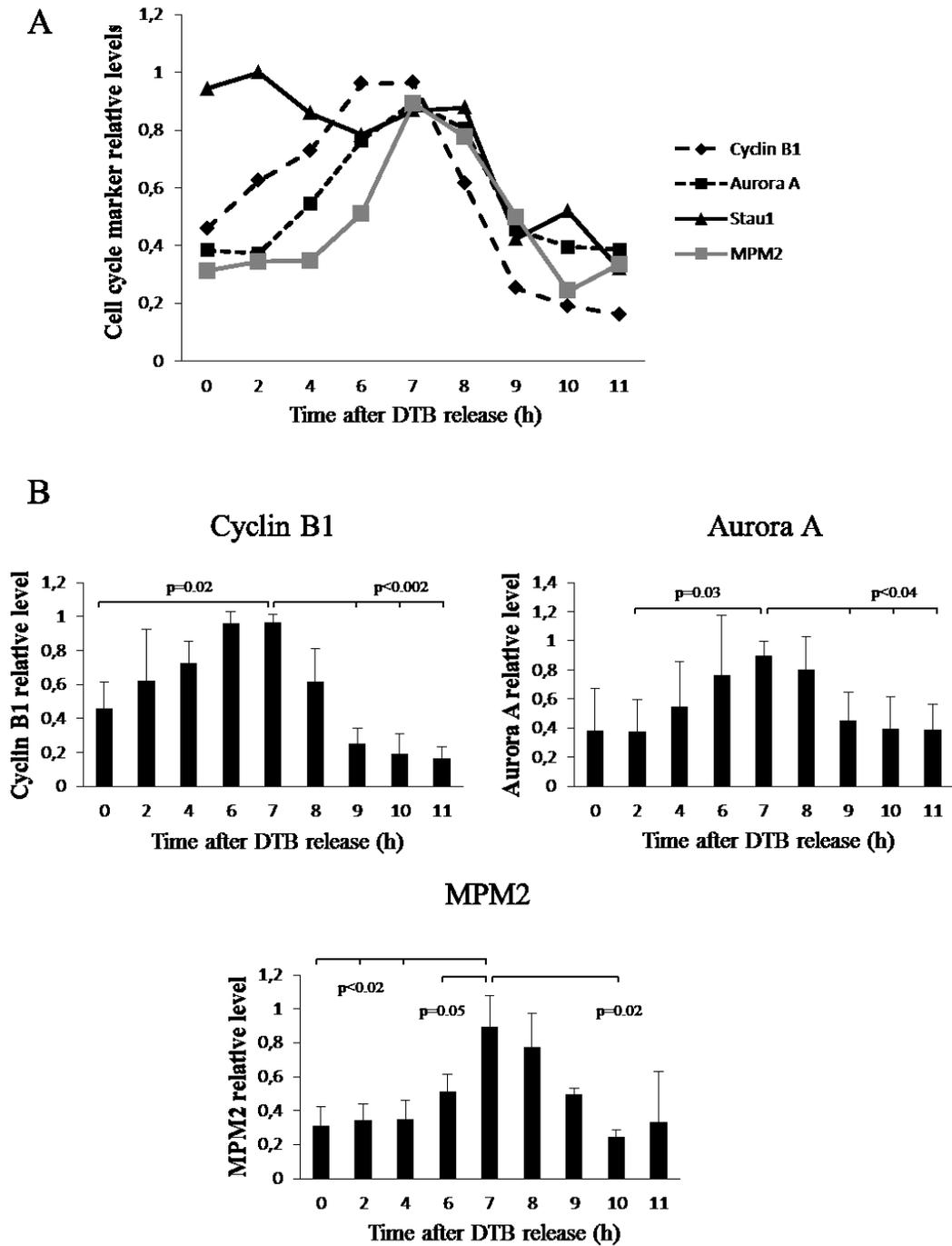
Figure 8

2.1.11. Legends to supplementary figures

Supplementary figure 1. Quantification of cell cycle markers of figure 1A. As described in the legend of figure 1A, HCT116 cells were grown asynchronously (AS) or were synchronized at the G1/S transition by a double thymidine block (DTB) and then released by addition of fresh medium. Cell extracts were prepared at different time points post-release as indicated and analyzed by Western blotting (figure 1A). CyclinB, marker of S, G2 and M phases; AuroraA, marker of G2 and M phases; MPM2, mitosis protein monoclonal 2 detects a variety of phosphorylated proteins during mitosis. A) Relative levels of Stau1 and cell markers at different time points post-release are plotted in the same graph. Data are from figure 1A (Stau1) and supplementary figure 1B (cyclin B1, Aurora A, MPM2). B) Quantification of the relative amounts of cell cycle markers at each time point. Standard deviations are shown and statistical analyses (Student's t-test) are indicated when significant. The ratios between each protein and β -actin levels were calculated at each time point of 3 independent experiments and the means and standard deviation were plotted relative to that obtained at the highest expression time point, which was arbitrarily set to 1.

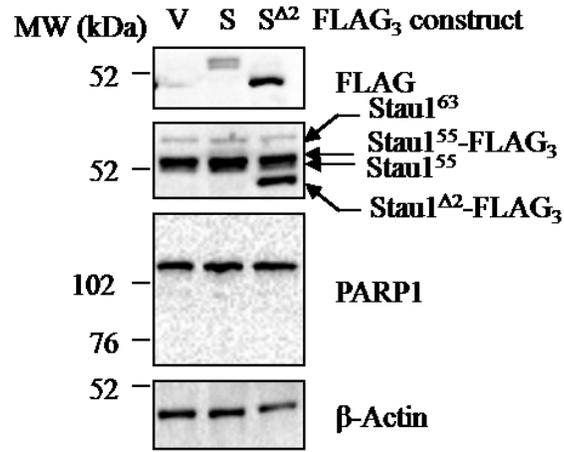
Supplementary figure 2. Stau1⁵⁵-FLAG3 expression does not induce cell death or cell cycle exit. HCT116 cells were infected with viruses expressing the empty vector or Stau1⁵⁵-FLAG3 or Stau1 Δ 2-FLAG3 as indicated and plated at the same density for 4 days. (A) Cell extracts were prepared and analyzed by western blotting. Anti-PARP1 antibody was used to monitor the levels of apoptosis. (B) The presence of quiescent cells was quantified by FACS after staining of infected cells with the Hoechst and pyronin Y solutions. Both a representative result and the means and standard deviation of 3 independently performed experiments are provided. (C) The percentage of senescent cells was evaluated by microscopy following staining of the cells with β -Gal. The statistical analysis (means and standard deviation) of 3 independently performed experiments is provided.

2.1.12. Supplementary figures

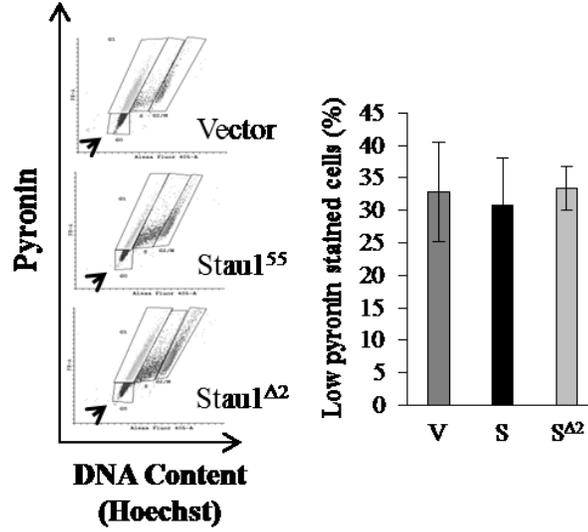


Supplementary figure1

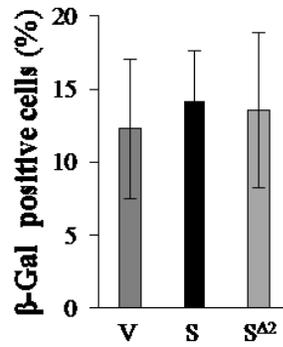
A



B



C



Supplementary figure 2

2.2. Article 2: Staufen1 downregulation impairs cell cycle transitions and cell proliferation in untransformed cells

2.2.1. Mise en contexte

En réalisant les essais de d'expression forcée de STAUI pour en étudier les conséquences sur la prolifération et la progression du cycle cellulaire, nous avons comparé plusieurs lignées de cellules, transformées et primaires. D'une manière étonnamment consistante, la surexpression de STAUI, même à des niveaux très bas, ralentit considérablement la vitesse de prolifération des cellules transformées, en l'occurrence les cellules du cancer colorectal HCT, les cellules de l'ostéosarcome U2OS, et les cellules embryonnaires du rein transformées HEK293. D'une manière toute aussi remarquable, la même démarche ne semble avoir aucune incidence sur les courbes de croissance des fibroblastes de poumons IMR90, et celles des cellules épithéliales de la rétine immortalisées hTert-RPE.

Estimant un rôle crucial dans la suppression tumorale et/ou l'inhibition de la prolifération, nous avons donc entrepris d'inhiber l'expression de STAUI dans les cellules cancéreuses par interférence à l'ARN, prévoyant une stimulation de l'activité proliférative de ces cellules. À notre grande surprise, la baisse des niveaux d'expression de STAUI n'a pas eu l'effet escompté sur les courbes de croissance des cellules transformées. Dans ce contexte, à la fois complexe et prometteur en termes de réflexions et d'hypothèses, et étant donné cette radicalité dans la différence de réponse à la modulation de l'expression de STAUI dans cellules tumorales versus les cellules non transformées, nous avons voulu étudier la nature du rôle que Staufen 1 adopte dans la régulation de la prolifération des cellules normales. Dans cette étude, nous avons utilisé principalement les techniques associées à l'interférence à l'ARN pour déjouer l'expression de STAUI.

Nos résultats suggèrent que STAUI est un acteur positif de la prolifération cellulaire. Son impact pourrait particulièrement atteindre les transitions G1/S et G2/M. Sa localisation particulière sur le fuseau mitotique pendant la métaphase et l'anaphase suggère un rôle dans le contrôle post-transcriptionnel d'une population d'ARN pendant la phase de division.

Ce manuscrit demeure en préparation puisque des expériences doivent encore être complétées avant sa soumission

Notes :

Contributions des auteurs

M. Ghram : Essais de formation de colonies, courbes de croissance, synchronisations cellulaires, essais d'analyse de la quiescence, analyses par FACS, Puces à PCR, PCR quantitative, immunoprécipitation à l'ARN, établissement de lignées cellulaires hTert-RPE sh-Stau1 stables, essais d'inhibition de l'expression de STAU1 par siARN, Western-blots, Microscopie, contribution à l'écriture du manuscrit.

S.Hsine : Synchronisations cellulaires, Microscopie, Purification du fuseau mitotique, Western-blots.

Stevenson Ly : Contribution aux synchronisations cellulaires, analyses par FACS et Western-blots.

Luc DesGroseillers : Supervision générale et écriture du manuscrit.

Staufen1 downregulation impairs cell cycle transitions and cell proliferation in untransformed cells

*Mehdi Ghram, Sami Hsine, Stevenson Ly and Luc DesGroseillers**

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4

Short title: STAU1 is involved in the G1/S and G2/M transitions in untransformed cells

* To whom correspondence should be addressed.

Dr Luc DesGroseillers, Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Pavillon Roger-Gaudry, Montréal, QC, Canada. H3T 1J4. Phone : 514-343-5802. Fax: 514-343-2210. Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

2.2.2. Abstract

We previously showed that the ribonucleic acid (RNA)-binding protein Staufen1 (STAU1) impairs cell proliferation when expressed in transformed cells. However, this anti-proliferative effect was not observed in untransformed cells. In this study, we now show that cell proliferation impairment occurs in untransformed cells when STAU1 expression is downregulated by RNA interference. Upon STAU1 depletion, cells accumulate in the G1 phase of the cell cycle at the expense of cells in the S and G2/M phases. Consistently, our results indicate that STAU1-downregulated cells do not enter the S phase of the cell cycle as efficiently as do control cells, when released from a G0 block. Interestingly, the expression of many genes involved in cell cycle regulation is deregulated in STAU1-depleted cells as compared to control cells, at the levels of both mRNAs and proteins. These genes code for proteins linked to gene ontology (GO) clusters such as “G1 phase”, “Cell cycle checkpoints” and “Mitotic cell cycle phase transition”. Consistent with the fact that these proteins are known to play major roles in the G1/S and/or G2/M transitions, we further show that STAU1-depleted cells are impaired in their capacity to enter and/or transit through mitosis. Finally, we show that STAU1 associates with the mitotic spindle suggesting that its downregulation may prevent the localization and processing of specific mRNAs during mitosis. These results suggest that STAU1-mediated post-transcriptional regulatory mechanisms occur during cell cycle phase transition and are required for proper cell proliferation.

2.2.3. Introduction

Cell division is a highly regulated process and several checkpoints have been identified that control exit from a specific phase of the cell cycle and allow entry into the next one (1,2). These processes require the differential expression of many critical proteins such as cell-cycle effectors whose functions are often controlled by post-translational modifications such as ubiquitination/degradation and/or phosphorylation (3-7). Nevertheless, transcription was shown to constitute the first level of regulation (8-11). However, transcriptional control often makes the cell-cycle effectors available ahead of schedule, thus additional regulatory mechanisms must be involved to explain how order is maintained during the different phases of the cell cycle. In this context, post-transcriptional regulation of gene expression is ideally suited to control the timing of gene expression (12-16) and thereby properly link protein synthesis to cellular needs with high precision (16-18). It was proposed that RNA-binding proteins (RBP) and non-coding RNAs have the capacity to tag and group functionally related mRNAs into RNA regulons and this ensures that proteins involved in a specific pathway are translated in a highly-coordinated fashion (16). Thus, even a slight alteration in the expression and/or activity of an RBP can profoundly affect the pathway(s) controlled by its bound mRNAs.

Staufen1 (STAU1) is an RNA-binding protein that is ubiquitously expressed in human cells. Alternative splicing of its mRNA generates two protein isoforms of 55 kDa (STAU1⁵⁵) and 63 kDa (STAU1⁶³) (19,20). It is now well established that STAU1 is a major regulator of RNA transport (21-23), translation (24-26), decay (27,28), nuclear export (29,30) and splicing (30). All of these functions of STAU1 are likely very important for cell physiology as compelling data indicate that it regulates cell differentiation (28,31-36), dendritic spine morphogenesis (23,37), RNA virus replication, as well as long-term synaptic plasticity (37), a mechanism for long term memory. A large fraction of STAU1-bound mRNAs are associated with translating ribosomes (25,26,38). Genome-wide analyses reveal that STAU1-bound mRNAs code for proteins with heterogeneous functions including transcription, translation, cell growth and regulation of cell cycle (25,26,39-42). Therefore, STAU1 may dictate the post-transcriptional expression of its bound transcripts and contributes to the control of cell proliferation.

Accordingly, we recently reported that STAU1 associates with important cell cycle regulators to influence cell proliferation (43). We demonstrated that STAU1 levels rapidly decrease as cells transit through mitosis as a result of its degradation by the E3 ubiquitin ligase anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) in association with its co-activators Cdh1 or Cdc20 through the ubiquitin-proteasome system. APC/C is activated during mitosis and is required to drive exit from mitosis. Importantly, expression of exogenous STAU1 impairs proliferation of cancer cells (HCT116, U2OS, HEK293), but, strikingly, has no effect on non-transformed cells (IMR90, hTERT-RPE1) (43). This anti-proliferative effect is due to a delay in mitosis progression. A similar link between STAU1 expression and cell proliferation was observed in a large scale screen of cDNA over-expression which identified STAU1 as one of the genes that inhibits colony formation in hepatoma 7721 cancer cells (44). All these results are consistent with the hypothesis that STAU1 expression is tightly linked to cell proliferation and could be altered during carcinogenesis (45).

In recent publications, STAU1 has been linked to mechanisms leading to cancers. In gastric cancers, the lncRNAs TINCR and HoxA11-AS whose expression is up-regulated by the transcription factors E2F1 and Sp1, respectively, bind to STAU1 and enhance STAU1-mediated decay (SMD) of mRNAs coding for cell cycle inhibitors (KLF2, CDKN2B, CDKN1A) (46-48). In contrast in colorectal cancers, the binding of lncRNA SNHG5 to mRNAs competes with STAU1-binding sites and prevents their degradation via SMD (49). In rhabdomyosarcomas, STAU1 expression is increased resulting in c-myc overexpression and enhanced cell proliferation, migration and invasion (50).

In this manuscript, we studied the role of STAU1 in untransformed cells and showed that STAU1 downregulation impaired cell proliferation. Our data identified both the G1/S and G2/M phase transitions as targets for STAU1 functions. Accordingly, expression of several genes coding for cell cycle regulators was modified upon STAU1 depletion. Finally, we showed that STAU1 is associated to the mitotic spindle during mitosis. Altogether, our results suggest that STAU1-mediated post-transcriptional regulation may play an important role in cell proliferation.

2.2.4. Material and methods

Plasmids, antibodies and reagents

Antibodies against cyclin A (CY-A1) and β -actin (Ac-74) were purchased from Sigma; against cyclin B1 from Santa Cruz. Monoclonal antibodies against STAU1 24 (Martel, RNA) were previously described. SmartPool On-TARGETplus-Non-targeting siRNA #1 (control) and On-TARGETplus SMARTpool-Human STAU1 siRNAs were purchased from ThermoFisher/Dharmacon.

Cell culture and synchronization

The human cell lines hTERT-RPE1 and IMR90 were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) or fetal bovine serum (Wisent), 100 μ g/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin (Wisent). Cells were cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. hTERT-RPE1 cells were synchronized in G₀ by serum starvation for 24h. Cells were then washed three times in phosphate buffer saline (PBS) and either collected (t = 0) or released in fresh medium for different time periods. For synchronization in late G₂, hTERT-RPE1 cells were incubated in the presence of 10 μ M of the Cdk1 inhibitor RO-3306 (Enzo Life Sciences Inc.) for 18 h as previously described⁴³. Cells were then washed three times in PBS and either collected (t = 0) or released in fresh medium for different time periods.

Flow cytometry analysis

Cell cycle distribution was determined by Fluorescence activated cell sorting (FACS). Cells were trypsinized and fixed in 70% ethanol at -20°C for at least 2 h. Cells were resuspended in PBS containing 40 μ g/ml propidium iodide and 100 μ g/ml RNase A. After incubation for 1 h at 37°C cells were characterized. Data was acquired using a BD LSRII apparatus and analyzed using the FlowJo. For each experiment, 10⁴ cells were analyzed. Quiescent cells were detected by FACS after labeling of the cells with pyronin Y (Sigma) and Hoechst (Fisher) as described⁵¹. To quantify the percentage of dividing cells, hTERT-RPE1 cells were pulsed with EDU for 1 hour and then harvested and analysed using the EdU - Click-IT assay as described by the manufacturer. Quiescent cells were detected by FACS after labeling of the cells with pyronin Y (Sigma) and Hoechst (Fisher) as described (40).

Growth curves and colony formation assays

Cells were plated at the same density (day = 0). For growth curve assays, cells were harvested every day and the number of cells was counted with a hemocytometer. For colony formation assays, cells were grown for a time period ranging from 10 to 14 days as indicated. Cells were then washed two times with PBS and coloured with 0.5% crystal violet in 50% methanol for 10 min. After extensive washes in water, plates were dried and scanned. Colony formation was determined by measuring absorbance at 590 nm using a spectrophotometer after dissolving colonies from dried plates in a solution containing 0.1 M sodium citrate (pH 4.2) and 20% methanol.

Western blot analysis and immunoprecipitation of STAU1-bound mRNAs

Total-cell extracts were prepared in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% triton X-100, 2 mM sodium fluoride, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science), and protein concentrations were determined by Bradford assays. Cell extracts (10 to 20 µg) were analyzed by Western blotting. Data were collected either on X-ray films (Fujifilm) or with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories) and the Western blot signals were quantified with the ImageLab (Bio-Rad Laboratories) software.

For immunoprecipitation, hTERT-RPE1 cells were washed 3 times in PBS and protein extracts were prepared in lysis buffer. Lysates were cleared by centrifugation at 15 000 g for 15 min. Immunoprecipitation was performed with anti-STAU1 antibody or with anti-HA as control. To determine the steady state level of mRNAs, RNA was isolated from cell extracts using the TRIZOL Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA was resuspended in 50 µL water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). The PCR array kit (PAHS-020) from SA-Biosciences was used to reverse transcribe and PCR amplify 84 mRNAs according to the manufacturer's procedure. qPCR amplification was done with the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the LightCycler 480 instrument (Roche).

Microscopy

For the analysis of cytoskeleton-associated proteins, cells were first extracted in 0.3% (v/v) Triton X-100 before fixation as previously described (Luo). Proteins were revealed by immunofluorescence using the Zeiss Axio-observed Z1 spinning disk fluorescence microscope.

Spindle isolation

Cells were synchronized to late G2 phase with RO-3306 (Sigma), then released in fresh medium before collection by mitotic shake-off. Mitotic spindle protein isolation was carried out as described (52). Briefly, the cells were collected in PBS by mitotic shake-off and resuspended in 20 ml of RPMI medium. A small aliquot (750 μ l to 1 ml) of hTert-RPE cells lysate in RPMI was set aside before cell lysis and resuspended in lysis buffer containing 5 mM Tris (pH 7.4), 1% Triton-X 100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 40 μ g/ml Leupeptin, a complete EDTA-free protease inhibitor (one tablet per 5 ml; Roche, Sydney, Australia). The cells were allowed to progress through mitosis for ~40 min at 37 °C until they reached metaphase. At ~35 min, the mitotic spindles were stabilized by the addition of Taxol (5 mg/ml, Sigma). The cells were washed in a solution containing 5 μ g/ml Taxol, 2 μ g/ml Latrunculin B and 1 mM PMSF. The cells were centrifuged at 300 g and the pellet was resuspended in spindle lysis buffer (100 mM Pipes at pH 6.9, 1 mM MgSO₄, 2 mM EGTA, 0.005% Nonidet P-40, 5 μ g/ml Taxol, 2 μ g/ml Latrunculin B, 200 μ g/ml DNase I, 10 μ g/ml RNase A, 20 U/ml Benzonase HC, 1 μ g/ml Pepstatin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Aprotinin, and 1 mM PMSF) for 20 min at 37 °C. The pellet was harvested (1000 g, 3 min) and incubated again in spindle lysis buffer for 5 min. The lysate was centrifuged again and washed twice (incubated for 20 min at 37 °C and spun at 2000 g for 5 min) with a low ionic strength buffer containing 1 mM Pipes pH 6.9 and 5 μ g/ml Taxol. An aliquot of the isolated mitotic spindles (20 μ l) was resuspended in 4% paraformaldehyde for confirmation of mitotic spindle isolation by microscopy. The spindle lysate was finally resuspended in 0.1 M Glycine, pH 2.8 and sonicated to disaggregate the spindles for analysis by western blot.

2.2.5. Results

STAU1 downregulation impairs cell proliferation in untransformed cells

We previously showed that exogenously expressed STAU1 impaired proliferation of transformed cells but not that of untransformed cells (43). In contrast, STAU1 downregulation by RNA interference had no consequence on the proliferation rate of transformed cells. To determine if the same phenotype is observed in untransformed cells, hTERT-RPE1 and IMR90 cells were transfected with siRNA against STAU1 and allowed to grow for 10 days in a colony assay (Fig 1A). Non-targeting (NT) siRNA was used as control. Upon expression of siRNA-STAU1, both cell lines showed a decreased expression of STAU1 as expected. STAU1 depletion impaired cell proliferation as compared to control cells. Growth curve experiments were used to confirm these results. hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA-NT or siRNA-STAU1 as indicated, plated at the same density and allowed to grow for five days. Cells were harvested every day and the number of cells was counted using a hemocytometer (Fig 1B). Western blot experiments indicated that STAU1 expression almost completely disappeared in siRNA-STAU1-transfected cells at day 0 and slowly increased at days four and five. As a consequence, cell growth was clearly impaired as compared to control cells. Similar results were obtained with shRNA against STAU1 in hTERT-RPE1 cells (data not shown). These results indicate that STAU1 downregulation impairs proliferation of untransformed cells.

STAU1 downregulation leads to the accumulation of cells in G1 phase

Therefore, we next tested whether STAU1 downregulation affects a specific step of the cell cycle. We hypothesized that if STAU1 is required for the transit through a step of the cell cycle, the percentage of cells in that phase should increase when STAU1 is downregulated. To address this possibility, hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA-NT or siRNA-STAU1 and collected two days post-transfection. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was analyzed by FACS. Our data revealed a higher percentage of cells in G1 in knockdown cells than in control cells, concomitant with a lower percentage of cells in the S and G2/M phases (Fig 3A). These results suggest either that STAU1-downregulated cells exit the cell cycle and enter the G0 phase or that they have an impaired G1/S phase transition.

STAU1-downregulated cells do not accumulate in the G0 phase

To test the first hypothesis, cells were transfected with siRNA-NT or siRNA-STAU1, allowed to grow for 48h and harvested. Cells were stained with pyronin and Hoechst and analyzed by FACS. The same percentage of quiescent cells was observed in both conditions (Fig 2) indicating that STAU1-downregulated cells do not accumulate in the G0 phase.

STAU1 downregulation decreases the number of dividing cells

If the G1/S transition is altered as a consequence of STAU1 downregulation, the number of dividing cells should decrease. Therefore, we calculated the percentage of cells that incorporate EdU as a measure of DNA replication during the S phase. Cells were transfected with siRNA-STAU1 or siRNA-NT, allowed to grow for 48h and pulsed for 1 hour in the presence of EdU. Cells were collected and analysed by FACS. A decrease in the percentage of EdU-positive cells was observed following downregulation of STAU1 as compared to control cells (Fig 3B), indicating that STAU1 is required for proper cell division in untransformed cells.

STAU1 downregulation impairs the G1/S phase transition

To test the efficacy of the G1/S phase transition in STAU1-depleted cells, cells were synchronized in the G0 phase of the cell cycle by serum starvation for 24 h and then released from the block with fresh serum for increasing time periods. Cells were collected at different time points. First, cells were stained with pyronin and Hoechst to calculate the percentage of quiescent cells after serum starvation. As expected, more than 80% of the cells were in the G0 phase (Fig 4A). As control of quiescence, we monitored the phosphorylation state of RB by western blotting and showed the absence of phospho-RB in serum-starved cells, as expected. Upon serum addition, most of the cells rapidly re-entered the cell cycle. Western blotting on cell extracts collected at each time point revealed that STAU1 expression was reduced in G0 and increased as cells re-entered the cell cycle (Fig 4A).

Then, hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA-NT or siRNA-STAU1 and tested for their capacity to exit the G0 and G1 phases of the cell cycle and to enter the S phase. Transfected cells were synchronized in G0 by serum-starvation for 24h, then re-fed with serum and collected at different time points. Cells were analyzed by FACS to determine the

timing of S-phase entry (Fig 4B,C). Our data indicate that S-phase entry was delayed by at least 2h in STAU1-downregulated cells as compared to control cells suggesting impaired mechanism of G1/S transition. Proteins in cell extracts were analyzed by western blotting (Fig 4D). As expected, STAU1 expression was inhibited in siRNA-STAU1 infected cells and cyclin A is less expressed in these cells suggesting a delay in S phase entry.

STAU1 downregulation decreases expression of genes involved in cell cycle progression and increases expression of genes required for cell cycle arrest

To decipher the molecular mechanism by which STAU1 downregulation impairs S phase entry, we quantified the expression of 84 genes involved in cell cycle regulation. This repertoire of genes is composed of sub-population of genes that control specific phases of the cell cycle or their transition. hTERT-RPE1 cells were stably infected with retroviruses expressing shRNA-NT or shRNA-STAU1. Cells were collected and mRNAs for 84 genes were quantified by RT-qPCR (Fig 5A). Our data (n=4) indicated that 24 genes were downregulated and 11 genes were upregulated in shRNA-STAU1 cells as compared to control cells. Interestingly, the observed decrease in gene expression at the levels of mRNA in shRNA-STAU1 cells correlates with a decrease at the protein levels for several of the genes (Fig. 5B). Indeed, the diminution of the protein levels seems to be more pronounced than that of the corresponding mRNAs. In addition, clear dephosphorylation of RB1 and phosphorylation of CDK2 were visible in shRNA-STAU1 cells. Dephosphorylation of RB1 normally prevents its activation and thus contributes to inhibit E2F1-mediated G1/S transition, whereas Cdk2 phosphorylation is inhibitory.

Strikingly, using the MCODE algorithm from Metascape (<http://metascape.org>) to analyze down- and up-regulated genes, neighborhoods were identified where proteins are densely connected (Fig 5C). Two MCODE networks were identified following analysis of the downregulated genes and one with upregulated genes. Further gene ontology (GO) enrichment analysis assigned the “meanings” Cell cycle, G1/S transition and Mitotic G1/S phases to the network components of downregulated genes and Cell cycle and Regulation of mitotic cell cycle transition to those of upregulated genes. Similarly, a GO enrichment analysis using DAVID bioinformatics resources indicated that down- and up-regulated genes are enriched in genes coding for proteins involved in the cell cycle, G1 phase, positive regulation of G1/S

transition and cell cycle checkpoints. Interestingly, GO clusters for G2/M transition and mitotic process were also highlighted, suggesting that STAU1 depletion may also affect G2/M transition and/or mitosis.

STAU1 downregulation also impairs G2/M transition

Therefore, we tested whether STAU1 downregulation impairs cell proliferation at the level of the G2/M transition. Cells were transfected with siRNA-NT or siRNA-STAU1 and allowed to grow for 24h. Cells were then synchronized in late G2 with the CDK1 inhibitor RO-3306 and then released for increasing periods of time. STAU1 expression was monitored by western blotting (Fig 6A) and the number of mitotic cells quantified by FACS (Fig 6B) as a measure of their entry into the G1 phase. As expected in control cells, the percentage of G2/M cells rapidly decreased as cells transit through mitosis to enter G1. In contrast, the percentage of G2/M cells in STAU1-downregulated cells did not decrease indicating that cells are blocked in late G2 or in M phases.

STAU1 is associated with the mitotic spindle during mitosis

To get first clues on the role of STAU1 during mitosis, we mapped its sub-cellular localization as a means to predict partners and/or pathways in which it could be involved. hTERT-RPE1 cells were synchronized in late G2 with RO-3306 and released from the block in normal medium. Cells were fixed at different time points and stained for tubulin and STAU1 using specific antibodies. DNA was stained with DAPI. Cells were also treated with Triton-X100 before fixation to remove soluble materials (Fig 7A). In asynchronous cells, our data indicated that STAU1 was localized in the cytoplasm in a punctate pattern similar to that of the rough endoplasmic reticulum as previously described. Strikingly, the pattern was different in mitotic cells. In addition to its broad localization in the cell, STAU1 also co-localized with tubulin on the mitotic spindle. This is particularly visible during prophase and metaphase. During anaphase, STAU1 accumulated in the mid-region between separating chromosomes where most of the tubulin was excluded. During cytokinesis, part of STAU1 was found in the tubulin bridge between dividing cells.

To confirm a putative association between STAU1 and the mitotic spindle, we characterized biochemically purified spindle preparations. Cells were synchronized in mitosis

and microtubules were stabilized with paclitaxel. Spindles were purified and associated proteins were identified by western blotting (Fig 7B). Interestingly, STAU1⁵⁵ but not STAU1⁶³ co-purified with the spindle. As expected, tubulin and aurora kinase A were also found in this sub-cellular preparation whereas actin, calnexin and histone H3, used as negative controls, were absent. The ribosomal protein S6 was also found on the spindle suggesting that translation and/or segregation of RNA granules occurs on the spindle. As a proof of specificity, we noticed that the RNA-binding paralog STAU2 was not associated with the mitotic structure.

2.2.6. Discussion

STAU1 appears to promote proliferation in general, and G1/S and G2/M transitions in particular, specifically in untransformed IMR90 fibroblasts and hTert-RPE cells. These results are particularly interesting as the downregulation of STAU1 levels negatively affects the expression of pro-proliferation genes such as E2F1, DP1, SKP2, Cyclin B, MCM4 and KI67. The downregulation of these specific set of genes involved in promoting of the cell cycle transitions is accompanied by increased expression of genes involved in cell cycle checkpoint and inhibition of cycle progression. This includes for example CHK2, MRE11 and p21. In accordance with these results, studies on the differentiation of C2C12 cells into myotubes show that STAU1 is a pro-proliferation and anti-differentiation protein (33-35). This conclusion is based on two observations: the first is that the lowering of STAU1 expression levels is required for the differentiation process. The second is that the importance of STAU1 inhibition is due to the fact that STAU1 promotes active translation of the c-MYC factor, known for its activating roles in cell proliferation and differentiation inhibition.

Cell imaging revealed the presence of a STAU1 sub-population on microtubules forming the mitotic spindle. This observation is maintained in prophase and metaphase until anaphase. The biochemical approach allowed us to co-localize STAU1 on the mitotic spindle with tubulin, the main component of spindle microtubules, the Aurora A kinase, a well-known mitotic kinase, as well as the mitotic marker MPM2.

Interestingly, STAU2 does not co-localize with STAU1 on the mitotic spindle, whereas the ribosomal protein S6 is largely detected in the mitotic fraction. The absence of STAU2, defined as a partner of STAU1 in SMD (53) and the presence of S6 protein, associated with STAU1 to ribosomes (24), suggests that the influence of STAU1 on mitosis, specifically on the mitotic spindle, tends towards others functions other than SMD, such as translation or mRNAs localization. Since the localization of STAU1 to the mitotic spindle is partial, one might think that other STAU1 functions take effect around the mitotic spindle. The importance of mRNA STAU1-mediated localization at mitosis would be because the cellular material, including the RNAs, must be distributed in the daughter cells in a very precise manner. In addition, the cell could use localized-translation mechanisms of essential proteins to regulate

the cell exit from mitosis. Other studies even suggest that the RNA-microtubule association helps stabilize the mitotic spindle (54).

The observation that STAUI⁶³ isoform doesn't localize to the mitotic spindle reinforces the hypothesis that the STAUI isoforms have different cellular functions and locations. It would therefore be interesting to further investigate these differences by the development of specific inhibition tools and expression mutants for STAUI⁶³, to unravel the differential functions of isoforms 55 and 63 during the cell cycle, and especially during mitosis.

The positive role of STAUI on cell proliferation, reported in this work, is consistent with the reported gain of function in both the embryonic and alveolar subtypes of rhabdomyosarcoma (50). Indeed, Jasmin and colleagues observed a significant increase in STAUI expression, at both mRNA and protein level, in cancer lines and tissues compared to controls. This overexpression results in significant effects on the proliferative, anti-apoptotic and metastatic potential of this type of tumors. Mechanistically, much remains to be discovered about the molecular functions of Staufen1 that ensure tumor cells survival and activate the pathways of cell migration and invasion.

The fact that STAUI is multi-functional suggests that there are several subpopulations of the protein in the cell. In the context of the cell cycle, a modulation of its expression could differentially affect one or other of these subpopulations, and therefore imply a modulation of the functional balance between splicing, transport, translation and SMD, throughout the division cycle. Altering STAUI expression patterns could lead cells to abnormal proliferation state and contributes to cancer development.

2.2.7. References

- 1 Tyson, J. J., Csikasz-Nagy, A. & Novak, B. The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* 24, 1095-1109 (2002).
- 2 Tyson, J. J. & Novak, B. Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol* 18, R759-R768 (2008).
- 3 Berthet, C. & Kaldis, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 26, 4469-4477 (2007).
- 4 Bloom, J. & Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149-160 (2007).
- 5 White, J. & Dalton, S. Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 1, 131-138 (2005).
- 6 Pines, J. The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 5, 305-313 (1994).
- 7 Wolf, F., Sigl, R. & Geley, S. '... The end of the beginning': cdk1 thresholds and exit from mitosis. *Cell Cycle* 6, 1408-1411 (2007).
- 8 Bernards, R. Cancer: Entangled pathways. *Nature* 455, 479-480 (2008).
- 9 Daley, G. Q. Common Themes of Dedifferentiation in Somatic Cell Reprogramming and Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2009).
- 10 Chiu, K. P. et al. Pathway aberrations of murine melanoma cells observed in Paired-End diTag transcriptomes. *BMC Cancer* 7, 109 (2007).
- 11 Agger, K., Christensen, J., Cloos, P. A. & Helin, K. The emerging functions of histone demethylases. *Curr Opin Genet Dev* 18, 159-168 (2008).
- 12 Hieronymus, H. & Silver, P. A. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18, 2845-2860 (2004).
- 13 Moore, M. J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-1518 (2005).

- 14 Chan, C. S., Elemento, O. & Tavazoie, S. Revealing posttranscriptional regulatory elements through network-level conservation. *PLoS Comput Biol* 1, e69 (2005).
- 15 Gingerich, T. J., Feige, J. J. & LaMarre, J. AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev* 5, 49-63 (2004).
- 16 Keene, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8, 533-543 (2007).
- 17 Keene, J. D. Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic Acid. *Endocrinology* 151, 1391-1397, doi:151/4/1391 [pii] 10.1210/en.2009-1250 (2010).
- 18 Sanchez-Diaz, P. & Penalva, L. O. Post-transcription meets post-genomic: the saga of RNA binding proteins in a new era. *RNA Biol* 3, 101-109 (2006).
- 19 Marion, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. & Ortin, J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2212-2219 (1999).
- 20 Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. & DesGroseillers, L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2220-2230 (1999).
- 21 Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525 (2004).
- 22 Kiebler, M. A. et al. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19, 288-297 (1999).
- 23 Vessey, J. P. et al. 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 (2008).
- 24 Dugre-Brisson, S. et al. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 4797-4812 (2005).

- 25 Ricci, E. P. et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nat Struct Mol Biol* 21, 26-35, doi:10.1038/nsmb.2739 nsmb.2739 [pii] (2014).
- 26 de Lucas, S., Oliveros, J. C., Chagoyen, M. & Ortin, J. Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic Acids Res*, doi:gku073 [pii] 10.1093/nar/gku073 (2014).
- 27 Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L. & Maquat, L. E. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208 (2005).
- 28 Kim, Y. K. et al. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *Embo J* 26, 2670-2681 (2007).
- 29 Elbarbary, R. A., Li, W., Tian, B. & Maquat, L. E. STAU1 binding 3' UTR IRAlus complements nuclear retention to protect cells from PKR-mediated translational shutdown. *Genes Dev* 27, 1495-1510, doi:10.1101/gad.220962.113 27/13/1495 [pii] (2013).
- 30 Ravel-Chapuis, A. et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 196, 699-712, doi:10.1083/jcb.201108113 jcb.201108113 [pii] (2012).
- 31 Belanger, G. et al. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurochem* 86, 669-677 (2003).
- 32 Gautrey, H., McConnell, J., Lako, M., Hall, J. & Hesketh, J. Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1935-1942 (2008).
- 33 Yamaguchi, Y., Oohinata, R., Naiki, T. & Irie, K. Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells* 13, 583-592 (2008).
- 34 Gong, C., Kim, Y. K., Woeller, C. F., Tang, Y. & Maquat, L. E. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev* 23, 54-66 (2009).

- 35 Kretz, M. TINCR, staufen1, and cellular differentiation. *RNA Biol* 10, doi:26249 [pii] (2013).
- 36 Cho, H. et al. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Mol Cell* 46, 495-506, doi:10.1016/j.molcel.2012.03.009 S1097-2765(12)00216-X [pii] (2012).
- 37 Lebeau, G. et al. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28, 2896-2907 (2008).
- 38 Luo, M., Duchaine, T. F. & DesGroseillers, L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365, 817-824 (2002).
- 39 Furic, L., Maher-Laporte, M. & DesGroseillers, L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* 14, 324-335 (2008).
- 40 Laver, J. D. et al. Genome-wide analysis of Staufen-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic Acids Res* 41, 9438-9460, doi:gkt702 [pii] 10.1093/nar/gkt702 (2013).
- 41 LeGendre, J. B. et al. RNA targets and specificity of Staufen, a double-stranded RNA-binding protein in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 288, 2532-2545, doi:10.1074/jbc.M112.397349 M112.397349 [pii] (2013).
- 42 Sugimoto, Y. et al. hiCLIP reveals the in vivo atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature* 519, 491-494, doi:10.1038/nature14280 (2015).
- 43 Boulay, K. et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res* 42, 7867-7883, doi:10.1093/nar/gku506 (2014).
- 44 Wan, D. et al. Large-scale cDNA transfection screening for genes related to cancer development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15724-15729 (2004).

- 45 Zhu, Y. M. et al. [The expression of Staufen gene in colorectal cancer]. *Yi Chuan* 27, 705-709 (2005).
- 46 Xu, T. P. et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene* 34, 5648-5661, doi:10.1038/onc.2015.18 (2015).
- 47 Xu, T. P. et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death Dis* 8, e2837, doi:10.1038/cddis.2017.205 (2017).
- 48 Liu, Z. et al. Over-expressed long noncoding RNA HOXA11-AS promotes cell cycle progression and metastasis in gastric cancer. *Mol Cancer* 16, 82, doi:10.1186/s12943-017-0651-6 (2017).
- 49 Damas, N. D. et al. SNHG5 promotes colorectal cancer cell survival by counteracting STAU1-mediated mRNA destabilization. *Nat Commun* 7, 13875, doi:10.1038/ncomms13875 (2016).
- 50 Crawford Parks, T. E. et al. Novel Roles for Staufen1 in Embryonal and Alveolar Rhabdomyosarcoma via c-myc-dependent and -independent events. *Sci Rep* 7, 42342, doi:10.1038/srep42342 (2017).
- 51 Ren, S. & Rollins, B. J. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117, 239-251, doi:S0092867404003009 [pii] (2004).
- 52 Sillje, H. H., and Nigg, E. A. Purification of mitotic spindles from cultured human cells. *Methods* 38, 25–28 (2006).
- 53 Park E, Gleghorn ML, Maquat LE. 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(2):405-12. (2013).
- 54 Hussain S, Benavente SB, Nascimento E, Dragoni I, Kurowski A, Gillich A, et al. The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *J Cell Biol* 186(1):27-40. (2009)

2.2.8. Figures legends

Figure 1: STAU1 downregulation impairs cell proliferation. A) Untransformed cell lines (IMR90 and hTERT-RPE1) were transfected with a non-targeting (siNT) or an siRNA against STAU1 (siSTAU1) as indicated and plated at the same density for the colony formation assay. Left: western blot analysis of cells transfected with the indicated siRNA. Middle: representative data of three independently performed experiments. Right: Colonies were stained with crystal violet. The stain was extracted and quantified by measuring absorbance at 590 nm. Quantification of the relative amounts of stain in cells transfected with the non-targeting siRNA or siSTAU1 is expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments, absorbance of cells transfected with the non-targeting siRNA being arbitrarily fixed to 1. *P-value ≤ 0.05 . B) hTERT-RPE cells were transfected with a non-targeting (siNT) or an siRNA against STAU1 (siSTAU1) as indicated and plated at the same density. Cells were harvested every day for Western blot analysis (left), and the number of cells was counted using a hemacytometer (right). The graph shows the means and standard deviation of cell counts of three independently performed experiments.

Figure 2: STAU1 downregulation does not cause cell cycle exit. (A) hTERT-RPE cells were transfected with siNT or siSTAU1 as indicated. 48 hours later, cells were harvested as indicated and double stained by pyronin (RNA) and Hoechst (DNA) for flow cytometry analysis. Representative FACS images and results of average from three repeats are shown. Q1 region, representing the quiescent cells, is quantified. *P-value ≤ 0.05 .

Figure 3. Knockdown of STAU1 expression leads to the accumulation of cells in G₁ phase. hTERT-RPE cells were transfected with siNT or siSTAU1 as indicated. (A) 48 hours after, cells were harvested and subjected to cell cycle distribution analysis by flow cytometry. Quantification of the cell cycle distribution in three independent experiments are shown; *P<0.05, Student's t-test. Cells treated as described above were also harvested and subjected to western blot analysis to assess STAU1 and cell cycle markers expressions. (B) **STAU1 downregulation decreases the number of dividing cells.** hTERT-RPE cells were transfected with siNT or siSTAU1 as indicated. 48 hours later, cells were pulsed with EDU for 1 hour then harvested and analysed using the EdU - Click-IT assay as described.

Representative FACS images (left) and results of average from three repeats (right) are shown. *P-value \leq 0.05.

Figure 4: STAU1 downregulation impairs S phase entry. A) hTERT-RPE cells were serum-starved for 24 hours, then serum was added to the culture medium for the indicated periods. Cells were harvested at different time points as indicated and double stained by pyronin (RNA) and Hoechst (DNA) for flow cytometry analysis. Q1 region, representing the quiescent cells, is quantified. STAU1 and the G₀/G₁ transition marker ppRB expression were analyzed by western blotting. B) hTERT-RPE cells were transfected with control (siNT) and siRNA STAU1 (siSTAU1) cells, serum-starved for 24 hours and then released (time 0) for increasing time periods in fresh medium with serum as indicated. Cells were analyzed by FACS to calculate the percentage of cells in each phases of the cell cycle. A representative experiment is shown (B) as well as the means of three independently performed experiments (C). The graph represents the mean and standard deviation of the percentage of cells in S phase at specific time post-release. *P-value \leq 0.05. (D) Protein from cell extracts were analysed by western blotting.

Figure 5: STAU1 silencing modulates gene expression of cell cycle regulators in hTERT-RPE1 cells. A) mRNA expression of 85 genes coding for proteins involved in cell-cycle arrest and/or progression were analysed in hTERT-RPE1 cells stably expressing non targeting shRNA (shNT) or STAU1 targeting shRNA (shSTAU1), using the PCR array kit (PAHS-020) from SA-Biosciences. p-value \leq 0,05. B) Cell extracts were also analyzed by western blotting. The blots are representative of 3 independently performed experiments that gave similar results. C) Down- and up-regulated genes were clustered using the metaspape MCODE algorithm to identify neighborhoods where proteins are closely connected (<http://metaspape.org>).

Figure 6. STAU1 is required for proper mitosis transit. A) hTERT-RPE cells were transfected with siNT or siSTAU1 as indicated. 48 hours post-transfection, cells were synchronized at the G₂/M transition with RO-3306 at 10 μ M (t=0) and released for the indicated periods of time. Proteins in cell extracts were analyzed by western blotting. B) hTERT-RPE cells were transfected as in (A), synchronized at the G₂/M phase transition with RO-3306 and then released from the block. At different time points post-release, cells were

harvested and analyzed by FACS to calculate the percentage of cells in G₂/M phases. The means of three independently performed experiments are shown. The graph in represents the mean and standard deviation of the ratio of the number of cells in the G₂/M phases at specific time post-release over that at time 0. *P-value \leq 0.05.

Figure 7. STAU1 localizes to the mitotic spindle during metaphase. A) hTERT-RPE1 cells were left asynchronous or blocked in late G₂/M by the CDK1 inhibitor RO-3306. Cells were released from the block for increasing time periods, treated with Triton-X100 to release soluble materials and fixed. Cells were stained with specific antibodies as indicated and with DAPI to reveal DNA. (B) Cells were synchronized in mitosis and microtubules were stabilized with paclitaxel. The mitotic spindle from paclitaxel blocked cells were purified and associated proteins revealed by specific antibodies.

2.2.9. Figures

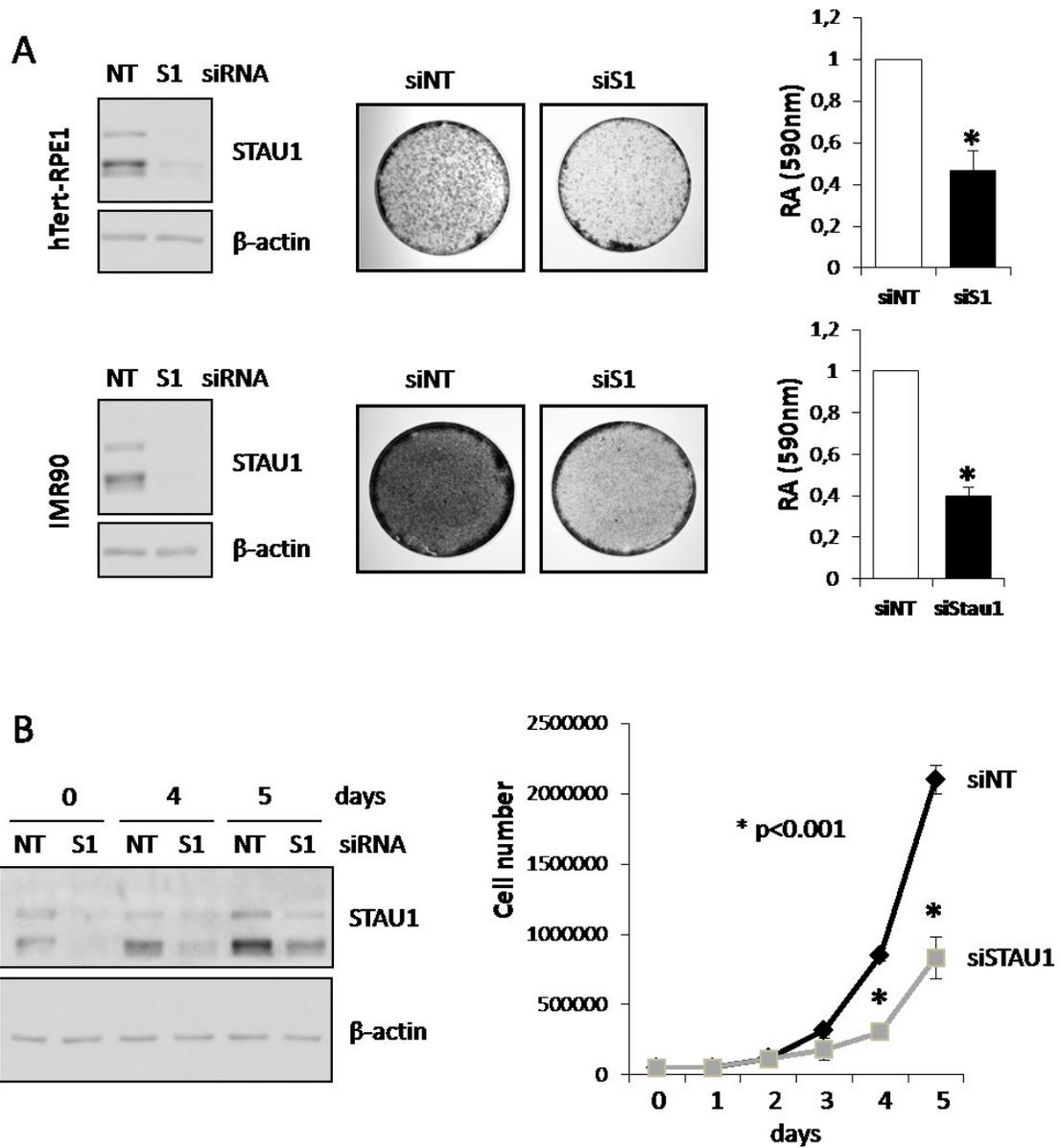


Figure 1

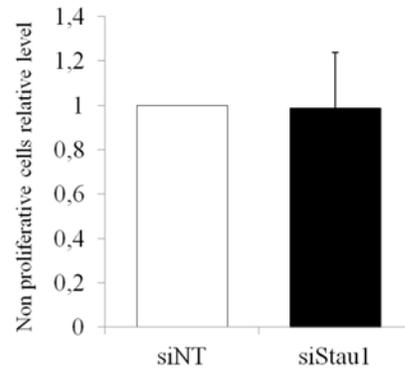
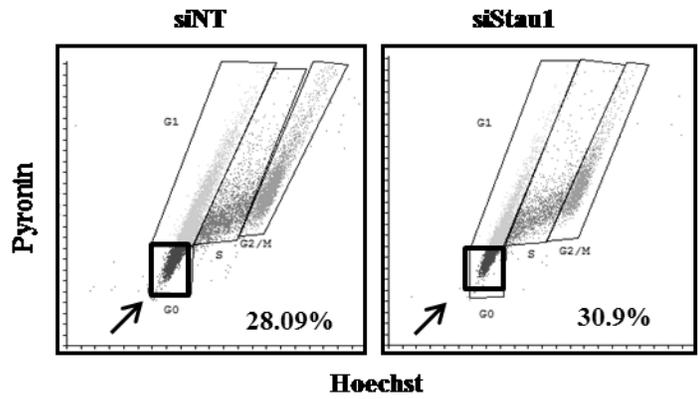


Figure 2

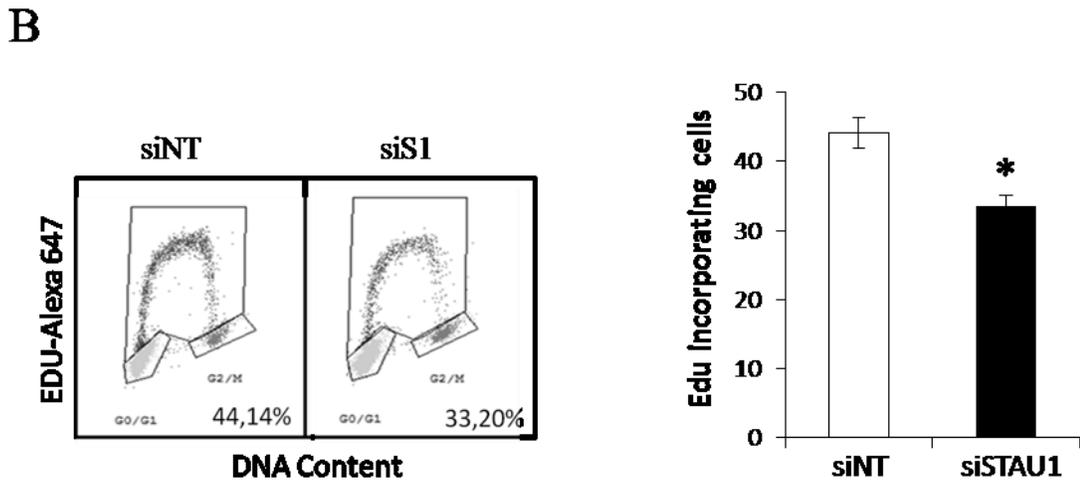
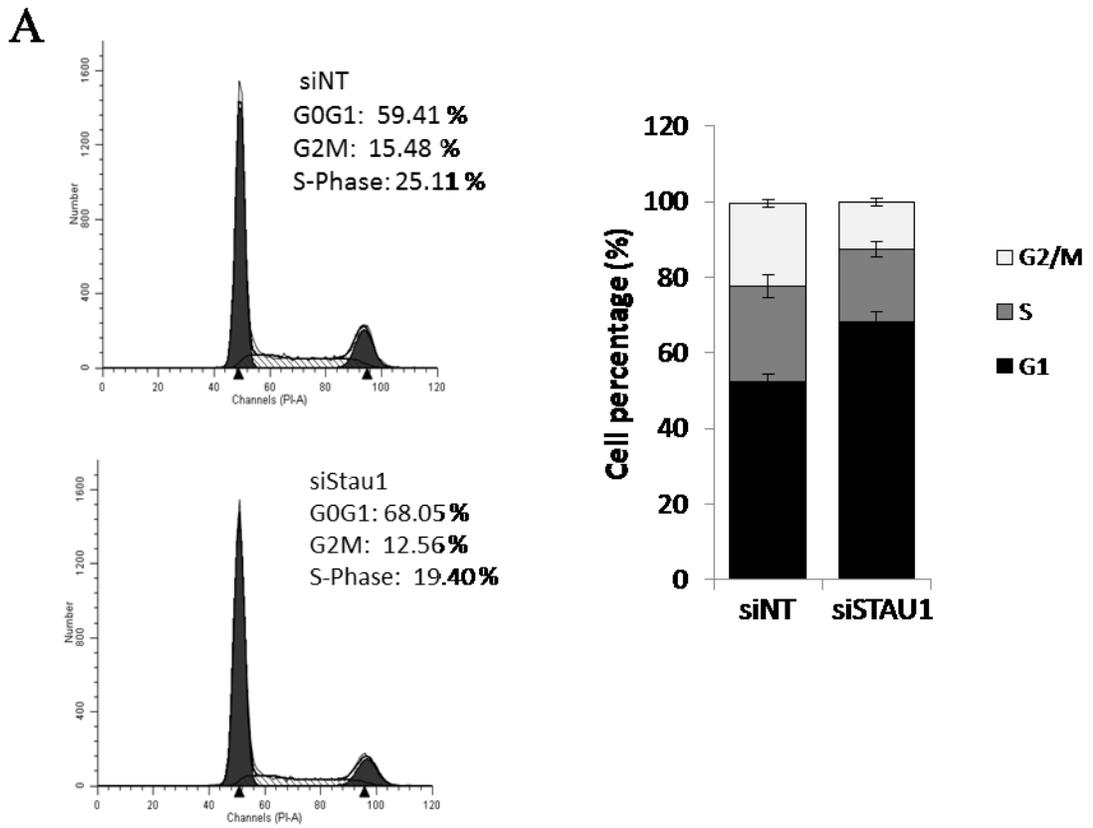


Figure 3

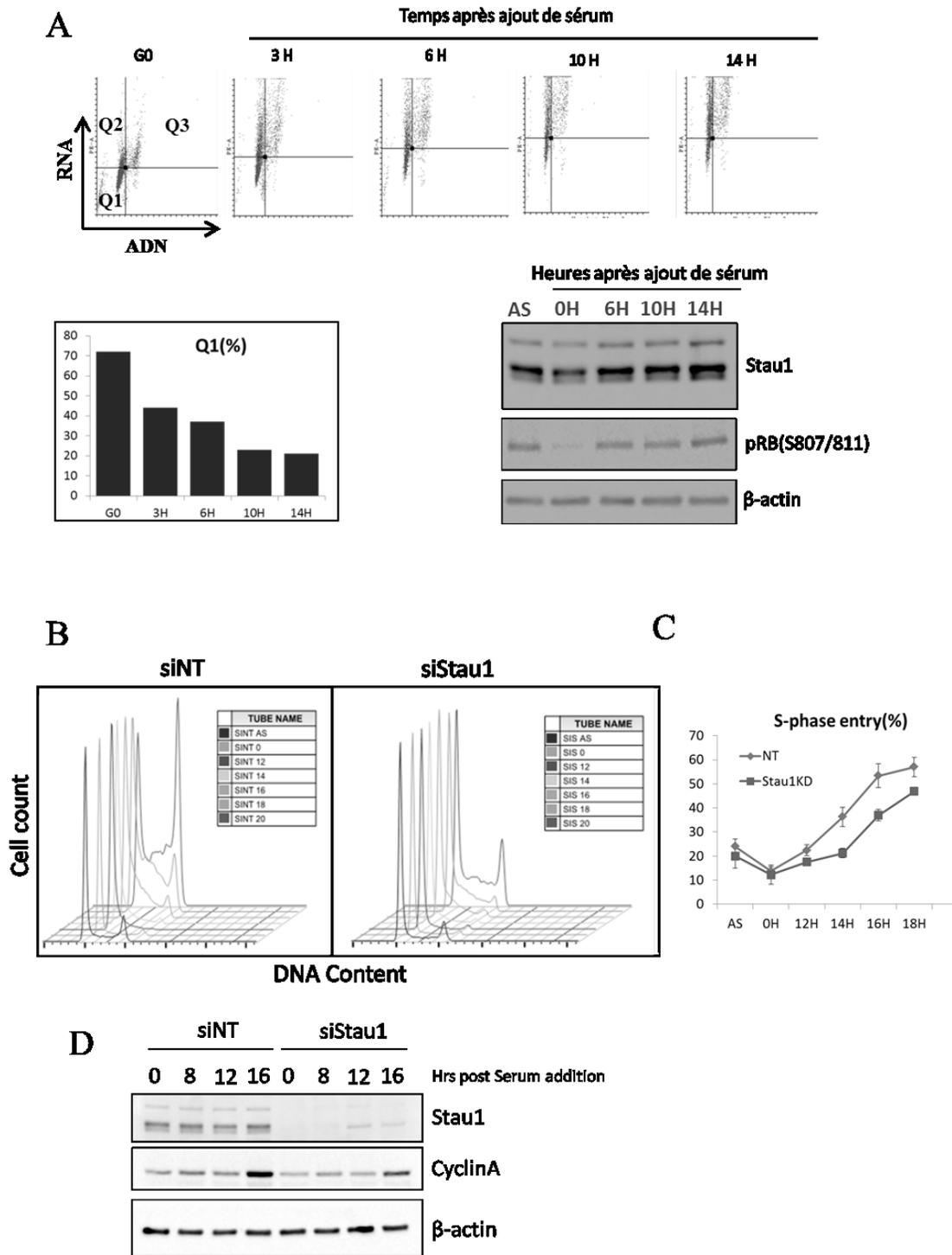


Figure 4

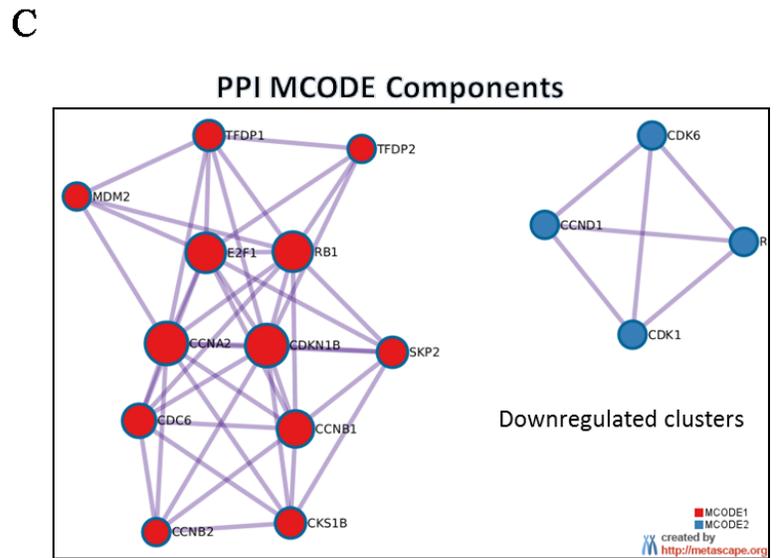
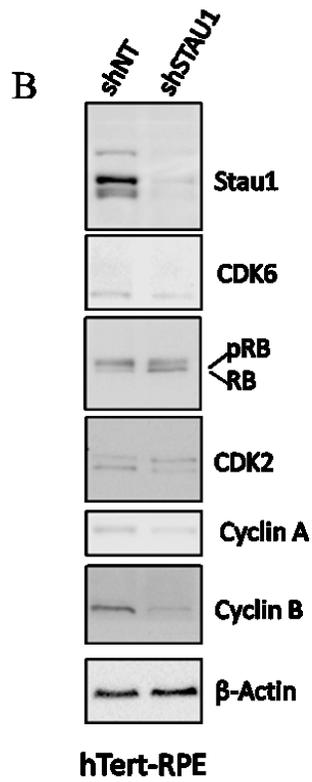
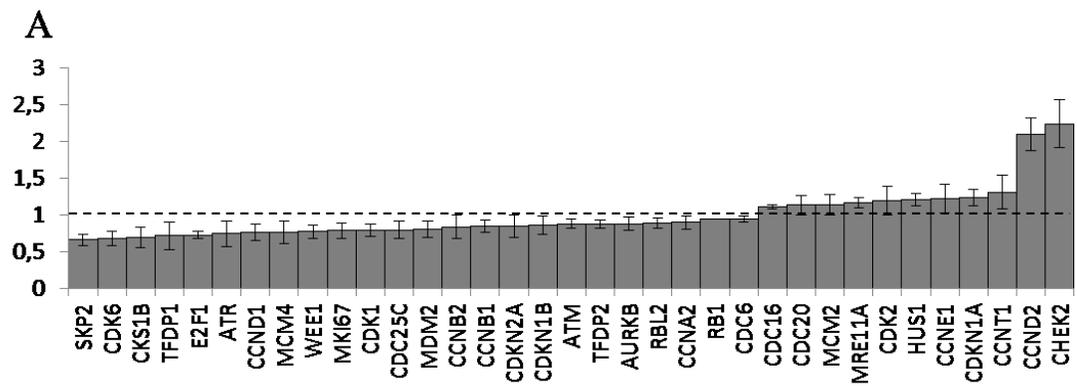


Figure 5

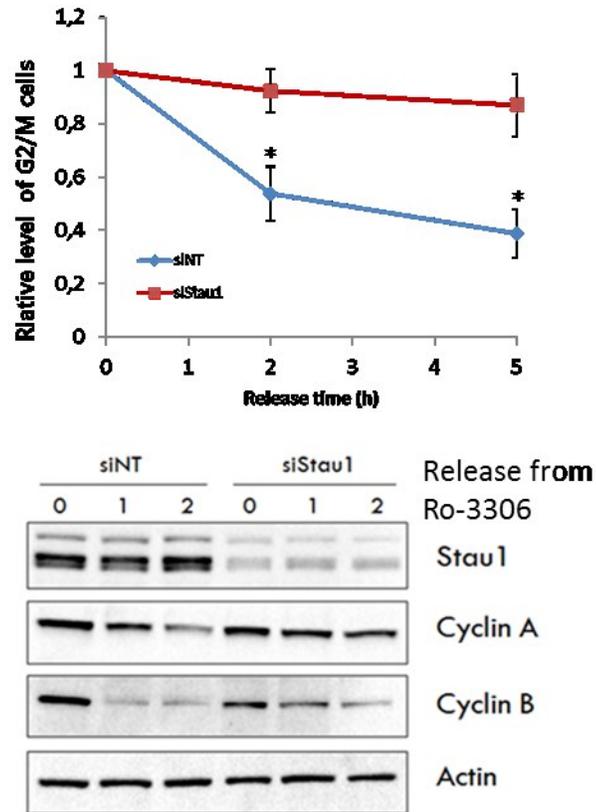


Figure 6

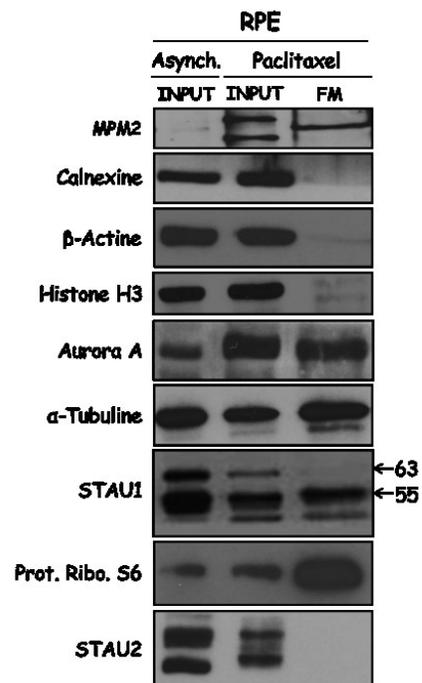
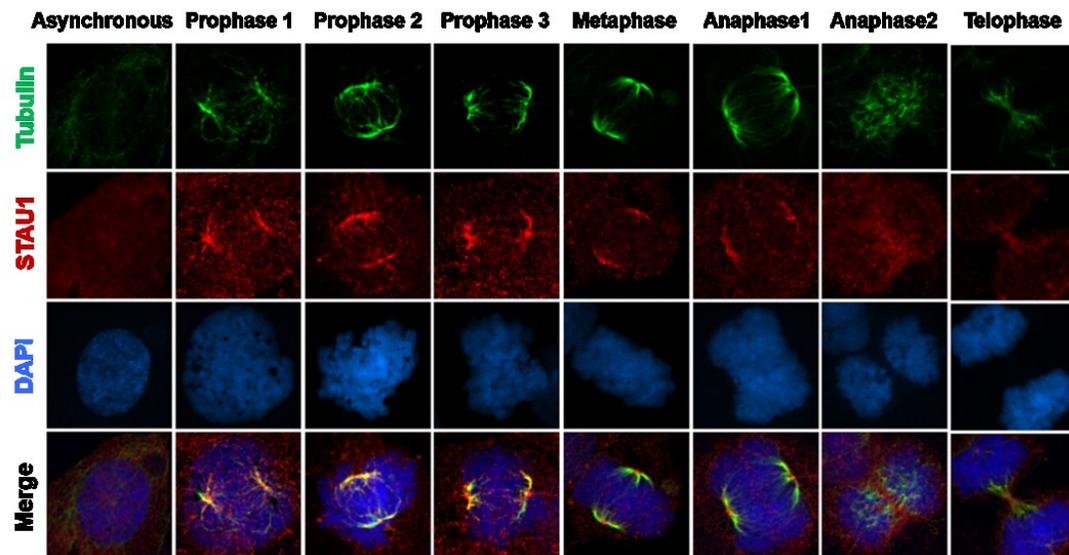


Figure 7

3. Discussion

L'ébauche des travaux entrepris dans le cadre de cette thèse de recherche était fondée sur les études, très rares à cette époque, portant sur l'identification des cibles potentielles de STAU1. Ces études, entrepris en majorité dans notre laboratoire, avait mis en évidence une sous-population d'ARNm codant pour des protéines impliquées entre autres dans le métabolisme cellulaire et la prolifération (section 1.3.10).

Nous étions alors inspirés par le concept émergeant des opérons post-transcriptionnels. Plusieurs de ces régulateurs d'ARNm, orchestrés le plus souvent par des protéines liant l'ARN, semblent jouer un rôle important dans la régulation des différents points de contrôle et phases du cycle cellulaire (section 1.2).

De par son potentiel régulateur polyvalent, Staufen1 nourrit une multitude d'hypothèses quant à son implication dans la régulation du cycle de division cellulaire, et ouvre un champ d'investigations considérable.

À l'issue de ces travaux, mes collègues et moi avons montré que les niveaux de STAU1 étaient sujets au contrôle post-traductionnel au cours du cycle cellulaire. En l'occurrence, STAU1 est ciblé par le complexe E3 ubiquitine-ligase APC/C-CDC20/CDH1 en sortie de mitose, pour être dégradé par le protéasome 26S. Nous avons également rapporté des effets opposés de STAU1 sur la prolifération et le cycle cellulaire et ce, par comparaison entre des cellules transformées et des cellules non transformées. Alors que son expression forcée ralentit considérablement la prolifération des cellules cancéreuses, et retarde leur sortie de la mitose, Staufen1 semble réguler d'une manière positive les transitions G1/S et G2/M du cycle de division des cellules non transformées. Nos travaux proposent que certaines des fonctions de STAU1 soient modulées en fonction des différentes transitions du cycle cellulaires, et qu'altérer cette modulation affecte considérablement la progression normale dans le cycle, ainsi que la prolifération globale.

Plusieurs des points sujets à l'analyse et à la discussion avaient déjà été abordés dans les sections Discussion pour les deux articles de cette thèse (voir sections 2.1.6 et 2.2.6). Plus particulièrement, les questions relatives à la régulation de STAU1 par le système ubiquitine-

protéasome et à sa pertinence au niveau moléculaire et fonctionnelle avaient fait l'objet d'une discussion approfondie (229), et laissent le champ à d'autres éléments pour l'analyse, l'interrogation et la mise en perspective. Dans ce qui va suivre, ces éléments seront analysés et évalués à la lumière des récentes publications, ainsi que des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire.

3.1. La régulation de Staufen1 au cours du cycle cellulaire

La baisse observée des niveaux d'expression de Staufen1 en sortie de mitose est indépendante de l'abondance de son ARNm, suggérant une dégradation par le système ubiquitine-protéasome (UPS). Le complexe E3 ligase APC/C, actif en sortie de mitose et au début de la phase G1, grâce à ses co-activateurs respectifs CDC20 et CDH1, s'est révélé être le modulateur principal des niveaux cellulaires de STAUI à ces stades du cycle cellulaire. Que ce soit dans les cellules transformées ou non, les niveaux de Staufen1 se retrouvent réduits jusqu'à la fin de la phase G1. Dans les cellules épithéliales pigmentées de la rétine, immortalisées par la télomérase humaine hTert-RPE, les niveaux de STAUI sont fortement diminués quand le milieu se trouve pauvre en facteurs mitogènes et que les cellules deviennent quiescentes (Section 2.2.9), et son expression augmente progressivement au fur et à mesure que les cellules atteignent la phase S. Ceci est tout à fait compatible avec le cadre temporel où APC/C-CDH1 est actif. La dégradation de Staufen1 en sortie de mitose n'est pas complète, et une fraction de la protéine semble demeurer protégée face à l'APC/C. Cette protection peut être due à une hétérogénéité des RNP associés à Staufen1. Ceci inclut par conséquent un rôle d'autres modifications post-traductionnelles qui vont affecter ses capacités d'interaction protéine-protéine ou protéine-ARN, ou bien influencer sa localisation. La phosphorylation est connue chez divers substrats de l'APC/C pour les protéger contre la dégradation par le système UPS (230). Un mécanisme impliquant la phosphorylation de STAUI pourrait donc limiter l'association de STAUI à l'APC/C. Cette hypothèse se trouve appuyée par le fait que STAUI est une phosphoprotéine, et que ses niveaux de phosphorylation pourraient varier le long du cycle cellulaire (229). L'importance de cette dégradation partielle peut provenir du fait qu'elle contrôle la balance fonctionnelle de STAUI pour la faire pencher du côté d'un mode d'action plutôt qu'un autre. D'ailleurs, l'association de STAUI à un groupe d'ARNm associé

au cycle cellulaire, et ce, d'une manière enrichie à l'entrée de la mitose, suggère que la dégradation partielle de Staufen1 libère ces ARNm de son influence pendant la fin du cycle.

Outre la phosphorylation mentionnée ci-dessus, Staufen1 pourrait être régulée par d'autres modifications post-traductionnelles au cours du cycle cellulaire. La sumoylation (231), la méthylation (231-233) et l'acétylation (231, 234) constituent des modifications de plus en plus documentées dans le contexte de la régulation du cycle cellulaire d'une part, et d'autre part pour influencer fortement le destin et les fonctions des protéines liant l'ARN. Par ailleurs, la méthylation de Staufen1 au niveau de l'arginine 108 a déjà été répertoriée dans les neurones, et les arginine méthyl-transférases PRMT3/8 seraient les enzymes potentielles pour cette modification (235). Dans une étude de protéomique à large échelle, la lysine à la position 189 de STAUI⁵⁵ a été validée comme étant un site d'acétylation (234). Il serait intéressant de vérifier l'étendue de l'influence que pourrait avoir l'une ou l'autre de ces modifications sur la stabilité, l'interaction protéine-protéine, l'activité et la localisation de STAUI au cours du cycle cellulaire.

3.2. La régulation du cycle cellulaire par Staufen1

Le fait que les niveaux de STAUI soient modulés au cours du cycle cellulaire suggère que cette modulation est importante pour ses fonctions régulatrices du cycle. Ainsi, il a été démontré qu'une expression forcée de Staufen1 dans les cellules transformées retarde la sortie de mitose, et ralentit considérablement la prolifération de ces cellules. Des études récentes indiquent la possibilité que STAUI puisse jouer un rôle dans l'apoptose (222, 227), la survie cellulaire (223) et la quiescence (192). Nos résultats indiquent que cet effet inhibiteur sur la prolifération dans les cellules du cancer colorectal HCT, ne passe, ni par l'activation des voies apoptotiques, ni par celles qui mènent à la sénescence ou mêmes par celles qui font sortir les cellules du cycle cellulaire (section 2.1.12. figure 2), et suggère plutôt un effet de ralentissement global des cellules dans leur progression. Une autre possibilité est qu'une forte expression de Staufen1 soit délétère pour les cellules tumorales, ce qui explique les faibles niveaux d'expression de STAUI exogène dans ces cellules. Cela pourrait relater une sélection

protectrice de la part des cellules transformées pour exprimer la protéine STAU1. Cette sélection garantit la survie cellulaire, même si elle en ralentit la vitesse de division.

Dans des cellules non transformées, comme les fibroblastes de poumon IMR90 ou bien les cellules hTert-RPE, STAU1 semble promouvoir la prolifération en général, et les transitions G1/S et G2/M en particulier. Ces résultats sont d'autant plus percutants que l'inhibition de l'expression de STAU1 affecte négativement l'expression de gènes pro-prolifération comme E2F1, DP1, SKP2, Cyclin B, MCM4 et KI67 (section 2.2.9. figure 5). Cette régulation négative des gènes impliqués dans la régulation positive des transitions du cycle cellulaire est accompagnée par la hausse d'expression de gènes impliqués dans les points de contrôle et l'inhibition de la progression du cycle. On peut citer CHK2, MRE11 et p21. En harmonie avec ces résultats, des études faites sur la différenciation des cellules C2C12 en myotubes montrent que le maintien forcé d'un niveau d'expression stable de STAU1 est une approche pro-prolifération et anti-différenciation et ce, en se basant sur deux observations : la première est que la baisse des niveaux d'expression de STAU1 est requise pour le processus de différenciation. La deuxième est que cette importance est due au fait que STAU1 favorise une traduction active du facteur c-MYC, connu pour ses rôles activateurs de la prolifération cellulaire et inhibiteurs de la différenciation. La baisse de Staufen1 pendant le processus de régulation est partielle, et la population de STAU1 persistante semble jouer un rôle positif dans la différenciation, par des mécanismes dépendants et indépendants du SMD (section 1.3.8.4).

Le fait que STAU1 soit multi-fonctionnel suggère qu'il existe plusieurs sous-populations de la protéine dans la cellule. Dans le cadre du cycle cellulaire, une modulation de son expression pourrait toucher d'une manière différentielle l'une ou l'autre de ces sous-populations, et impliquerait par conséquent une modulation de la balance fonctionnelle entre épissage, transport, traduction et SMD. Une approche préliminaire faite précédemment dans notre laboratoire aspirait à suivre le SMD en fonction du cycle cellulaire, et ce, à travers l'étude de l'interaction entre STAU1 et UPF1, son partenaire requis pour la dégradation des transcrits cibles (229). Selon ces résultats préliminaires obtenus dans les HEK293T, la stabilisation croissante de STAU1 jusqu'à l'entrée de la mitose, juste avant sa dégradation

partielle, est accompagnée d'une perte d'association significative avec UPF1, suggérant une perte d'efficacité du SMD en faveur d'autres mécanismes d'action.

Dans la même perspective, et afin d'évaluer le degré d'implication de STAU1 dans la traduction tout au long du cycle cellulaire, nous avons suivi l'association de STAU1 avec les polysomes dans les extraits de cellules synchronisées à différentes transitions (figure 1).

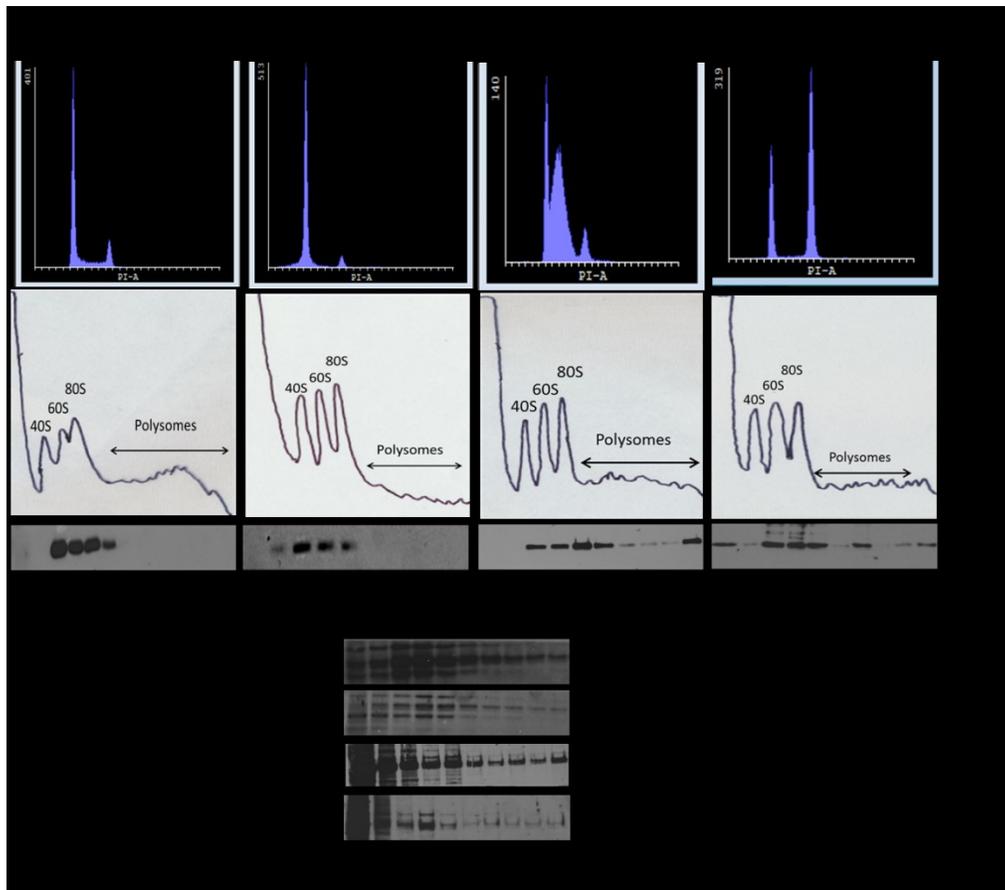


Figure1. Expérience préliminaire montrant que l'association entre Staufen1 et les polysomes varie en fonction du cycle cellulaire.

Les cellules hTert-RPE Asynchrones (AS) ont été sorties du cycle (G0) par privation de sérum pendant 24 heures, ensuite relâchées dans un milieu complet pendant 12 heures (G1/S) et 18 heures (G2/M). Les cellules (AS), celles en (G0), en (G1/S) et en (G2/M) sont collectées et les extraits cellulaires sont fractionnés par un gradient de sucrose afin de séparer les différentes fractions ribosomiques et polysomiques. Ces différentes fractions sont analysées par immunobuvardages de type Western, afin de détecter la protéine STAU1, ainsi

que les protéines ribosomales RPS6 (marqueur de la sous-unité 40S des ribosomes). Comme il a été rapporté auparavant (201), STAU1 se retrouve dans les fractions ribosomiques et polysomiques. À la quiescence, la proportion de STAU1 localisée dans les fractions lourdes est fortement diminuée et se retrouve enrichie à la transition G1/S pour diminuer encore une fois à la transition G2/M.

Ces résultats préliminaires montrent que la localisation de STAU1 aux polysomes varie dans le cycle cellulaire, et suggèrent que ses fonctions associées à la régulation de la traduction sont activées d'une manière préférentielle à la transition G1/S.

Il serait intéressant de démêler toute la dynamique fonctionnelle de STAU1 dans le contexte de la prolifération et de la division cellulaire. Les études antérieures de RIP (168, 169), RIPiT (207) ou de hiCLIP (208) menées à grande échelle, avaient déjà identifié des populations d'ARNm associées à STAU1, ou aux complexes RNP de STAU1. Cependant, ces études utilisent comme modèles les lignées HeLa ou HEK293, deux lignées de cellules transformées et particulièrement instables sur le plan génétique. La variabilité génétique et transcriptionnelle entre les différentes lignées cellulaires transformées, et même au sein de la même lignée, récemment démontrée dans la revue *Nature* (236), explique la grande hétérogénéité des résultats entre les différentes études. De plus, ces immunoprécipitations ont été réalisées sur des cellules asynchrones, ce qui fait que les cibles identifiées ne sont pas associées spécifiquement aux phases du cycle cellulaire. Enfin, l'approche, majoritairement utilisée pour ces travaux, consiste à immunoprécipiter des protéines STAU1 exogènes. Ceci ajoute donc une limite de plus quant à la spécificité et au réalisme des cibles identifiées. Afin d'étudier spécifiquement la dynamique des ARNm associés à STAU1 au cours du cycle cellulaire, une immunoprécipitation à l'ARN de la protéine STAU1 endogène, et dans des cellules hTert-RPE serait pertinente. Ces cellules seront bloquées puis relâchées pour être collectées à différentes phases du cycle cellulaire. L'utilisation de l'approche par hiCLIP, dépendamment des phases du cycle de division, permettra non seulement de valider les cibles potentielles de STAU1, mais elle mettra en évidence les sites et les structures de liaison en fonction de la progression du cycle cellulaire. Il serait ainsi intéressant de visualiser la dynamique de liaison de STAU1 avec ses cibles (alternances entre séquences en 5'UTR, en 3'UTR et au CDS, dynamique des structures secondaires ciblées, association au duplex intra et

intermoléculaires, implication des Long ARN non codants). Une purification des complexes protéiques de STAU1, couplée à l'analyse par spectrométrie de masse donnerait également un éclairage sur la dynamique d'interaction protéine-protéine dépendamment du cycle cellulaire. Les informations obtenus quant à la corrélation entre cibles post-transcriptionnels et partenaires protéiques, fourniront clairement des pistes sur le mode d'action de STAU1 vis-à-vis de ses cibles au cours des épisodes de prolifération (Épissage, transport, traduction et SMD).

3.3. Staufen1 est associé au fuseau mitotique

Les observations préliminaires stipulant une diminution significative, à la mitose, aussi bien du SMD que de la régulation traductionnelle, ne veulent pas dire une annulation complète, mais bien une baisse relative d'activité. D'autre part, ceci peut s'expliquer par l'orientation de STAU1 vers un autre mécanisme d'action comme le transport ou la localisation des ARNm cibles. Ceci semble d'autant plus pertinent que STAU1 est localisé au niveau du fuseau mitotique, aussi bien dans les cellules du cancer colorectal HCT que dans les cellules hTert-RPE (section 2.2.9. figure 7).

La microscopie a permis d'observer une fraction de la population STAU1 sur les microtubules formant le fuseau mitotique. Cette observation se maintient en prophase et en métaphase jusqu'à l'étape de l'anaphase. L'approche biochimique nous a permis de co-localiser STAU1 au fuseau mitotique avec la tubuline, composant principal des microtubules du fuseau, la kinase Aurora A, une kinase mitotique bien connue, et le marqueur mitotique MPM2. D'une manière très intéressante, STAU2 ne co-localise pas avec STAU1 au fuseau mitotique, alors que la protéine ribosomale S6 est largement détectée dans la fraction mitotique. L'absence de STAU2, définie comme un partenaire de STAU1 dans le SMD et la présence de la protéine S6, associée avec STAU1 aux ribosomes, suggèrent que l'influence de STAU1 à la mitose, spécifiquement au fuseau mitotique, penche plutôt vers des autres fonctions autres que le SMD, comme la traduction ou la localisation des ARNm. Étant donné que la localisation de STAU1 au fuseau mitotique est partielle, on pourrait penser que d'autres fonctions de STAU1 prennent effet aux alentours du fuseau mitotique. L'importance de la localisation des ARNm par STAU1 à la mitose serait du fait que le matériel cellulaire, y

compris les ARN doivent être répartis dans les cellules filles d'une manière bien précise. En plus, la cellule pourrait avoir recours à la traduction localisée de protéines essentielles à la régulation de la sortie de mitose (237). D'autres études suggèrent même que l'association ARN-microtubules aide à stabiliser le fuseau mitotique (238).

Un rôle de STAU1 dans la localisation ou le devenir des ARNm cibles au niveau du fuseau mitotique a été vérifié dans notre laboratoire. En effet, des cellules HCT-STAU1^{KO}, n'exprimant pas de STAU1, ont été générées par le système CRISPR/Casp9, et un séquençage ARN (RNA-seq) a été réalisé à partir du contenu des fuseaux mitotiques des cellules HCT-STAU1^{WT} et les cellules HCT-STAU1^{KO}. Cette étude a pu identifier des sous-populations d'ARNm enrichis et d'autres diminués au niveau du fuseau mitotique suite à la suppression totale de l'expression de STAU1. L'analyse des résultats est en cours, et il serait intéressant de connaître quels types ARNm perdent leur localisation spécifique, et quels ARNm sont localisés d'une manière dysfonctionnelle suite à la perte de STAU1. La présence de ces deux types de cibles renforce l'idée de la double fonction de STAU1 discutée plus haut, et pourrait expliquer sa double localisation, à la mitose, au fuseau et en dehors du fuseau. L'absence de l'isoforme STAU1⁶³ au fuseau mitotique renforce également l'hypothèse que les isoformes de STAU1 aient des fonctions et des localisations cellulaires différentes. Il serait donc intéressant d'approfondir les investigations sur ces différences, et notamment en développement des outils spécifiques d'inhibition et des mutants d'expression pour l'isoforme 63 afin de démêler les fonctions différentielles des isoformes 55 et 63 au cours du cycle cellulaire, et en particulier au niveau de la mitose.

À la différence des cellules cancéreuses HCT, où l'inhibition de l'expression de STAU1 n'affecte pas la prolifération cellulaire (229), la tentative de générer des cellules hTert-RPE-STAU1^{KO} a échoué, et les clones supposés être positifs finissent par mourir. Une des possibilités pour expliquer cet échec est le fait que STAU1 pourrait être, dans certains types cellulaires, requis pour la survie (227), la réponse au stress (217, 227) et la prolifération (section 2 et (191)). L'inhibition de l'expression de STAU1 par l'ARN interférence diminue drastiquement ses niveaux cellulaires, mais ne le supprime pas complètement. L'utilisation par les cellules d'une fraction de STAU1, même minime, pour assurer leur survie en priorité,

même au détriment d'une prolifération et d'une division normale, explique les différences de phénotypes observés entre les cellules siSTAU1 et les cellules STAU1^{KO}.

3.4. Rôles de Staufen1 dans la tumorigenèse

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse, sur l'implication de STAU1 dans la régulation de la prolifération, consolident deux éléments de réflexions sur le fonctionnement et la régulation de cette protéine : premièrement, la polyvalence de Staufen1 dans le contrôle post-transcriptionnel de ses cibles confère une importance capitale à la régulation de ses niveaux d'expression. Ces niveaux d'expression ayant un impact significatif sur la formation, la distribution et l'activité des différents RNP et régulons que pourrait former STAU1. L'altération, même minime, de la dynamique de son expression cellulaire, affecte considérablement la distribution fonctionnelle de cette protéine. Le deuxième élément de réflexion concerne la diversité fonctionnelle dépendante du type cellulaire et des stimuli extracellulaires. En effet, en compilant tous nos résultats, à la lumière de la série d'études récentes, on arrive à la conclusion qu'on ne pourrait pas baptiser STAU1 comme un oncogène ou comme un suppresseur de tumeur, dans l'absolu. Dans cette partie de la discussion, nous passerons en revue les différentes fonctions de STAU1 dans le développement tumoral de plusieurs types de cancers, en les comparant avec les résultats de nos travaux.

3.4.1. STAU1 est un frein au développement du cancer colorectal

À l'époque où nous abordions l'implication potentielle de STAU1 dans la régulation de la prolifération et le développement tumoral, aucune étude n'était encore publiée à ce sujet. Une exception concerne toutefois une étude, publiée en 2005 par un laboratoire chinois, qui décrivait une baisse d'expression de la protéine Staufen1 dans des tissus du cancer colorectal, en comparaison avec les tissus normaux adjacents, cette baisse ayant été observée par immunohistochimie (239). Cette étude suggérait que STAU1 pourrait être un inhibiteur du développement tumoral. Les travaux que nous avons entrepris dans les cellules du cancer colorectal HCT sont venus confirmer cette hypothèse, affirmant que l'expression de STAU1 dans ces cellules ralentit considérablement la prolifération cellulaire et instaure un retard dans

la sortie de la mitose. Ces résultats sont reproduits également dans les cellules provenant de l'ostéosarcome U2OS, ainsi que des cellules transformées du rein HEK293T (section 2.1).

Plus récemment, Damas et ses collègues ont élucidé un nouveau mécanisme d'action par lequel le Long ARN non codant SNHG5, surexprimé dans les cellules du cancer colorectal HCT, s'associe au 3'UTR de l'ARNm codant pour SPATS2, empêchant ainsi sa dégradation par le SMD. La stabilisation de l'ARNm SPATS2 favorise son expression et augmente la survie des cellules et leur résistance au traitement par l'oxaliplatine, un agent qui induit l'apoptose (223).

Le modèle proposé à la suite de ces travaux implique d'une part, la surexpression de SNHG5 et de SPATS2, et non la sous-expression de STAU1. D'autre part, le mécanisme d'action proposé stipule que STAU1 joue un rôle très clair dans l'induction de l'apoptose, et notamment dans la réponse des cellules au stress. Ce modèle est différent de celui que nous proposons dans le cas du cancer colorectal, d'autant plus que la surexpression de STAU1 dans les cellules HCT n'a aucun effet sur l'apoptose selon le test de clivage de PARP1 entrepris quatre jours suite à la surexpression de STAU1 (section 2.1.12. figure 2).

3.4.2. L'effet activateur de Staufen1 sur la prolifération lui confère le statut d'un oncogène : cas du rhabdomyosarcome embryonnaire et alvéolaire

Dans les cellules non transformées, nos résultats suggèrent fortement un rôle positif de STAU1 dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire. Ceci est mis en évidence, quand on inhibe l'expression de STAU1, par un retard de l'entrée des cellules en phase S, et par un délai des cellules au niveau de la transition G2/M, (section 2.2). Au niveau moléculaire, la baisse partielle de l'expression de Staufen1 affecte négativement plusieurs gènes répertoriés comme proto-oncogènes. On peut citer SKP2, DP1 et E2F1. Ces données nourrissent l'hypothèse stipulant que STAU1 pourrait être un oncogène à son tour. Cette hypothèse est renforcée par le rôle pro-prolifération et anti-différenciation de STAU1 dans les cellules C2C12 et les cellules du muscle squelettique en général. La fonction de STAU1 dans ce contexte a largement été étudiée et il s'avère qu'elle soit à la fois dépendante et indépendante de c-Myc, un autre oncogène bien étudié (183, 191).

Le rhabdomyosarcome est le sarcome des tissus mous le plus courant chez les enfants et les jeunes adultes. Les rhabdomyosarcomes sont des tumeurs de type muscle squelettique qui apparaissent généralement dans les lits musculaires et expriment les principaux facteurs de la régulation myogéniques. Cependant, leur programme de développement reste bloqué dans la phase proliférative, avec des cellules incapables de sortir du cycle cellulaire pour se différencier en myotubes. Le laboratoire Jasmin, dans une étude publiée récemment, décrit une nouvelle fonction de Staufen1 dans le développement du rhabdomyosarcome. Son équipe démontre que Staufen1 est nettement régulée à la hausse dans les tumeurs et les lignées cellulaires de rhabdomyosarcome humain par rapport au muscle squelettique normal. De plus, les résultats de ces travaux suggèrent que Staufen1 favorise la tumorigenèse des sous-types embryonnaires et alvéolaires du rhabdomyosarcome, à la fois en culture cellulaire et dans des modèles animaux. Enfin, les auteurs démontrent que Staufen1 a des rôles différentiels dans le rhabdomyosarcome embryonnaire ou alvéolaire, par le biais du contrôle des voies prolifératives et apoptotiques, respectivement. Nous comprenons donc que le fonctionnement du tandem Staufen1-C-MYC pourrait dévier dans le cas des rhabdomyosarcomes pour promouvoir leur potentiel prolifératif, et que STAUI, indépendamment de son rôle dans la traduction de c-MYC, est impliqué dans d'autres mécanismes préservant la survie cellulaire, via les voies anti-apoptotiques. Ce rôle de Staufen1, bien que nous n'ayons pas pu le mettre en évidence dans nos modèles cellulaires, a été rapporté par d'autres laboratoires, et sa fonction a été lié, sur le plan fonctionnel à la protéine de réponse au stress ADAR1 (222, 227).

Staufen1 semble également jouer un rôle central dans l'activation des voies qui favorisent la migration et l'invasion cellulaire, et les pertes de phénotypes associés à la motilité et l'invasivité des cellules, suite à l'inhibition d'expression de Staufen1 ont été observé autant dans les rhabdomyosarcomes embryonnaires que ceux alvéolaires. La corrélation positive entre les niveaux d'expression de Staufen1 et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses a déjà été observée dans le cas des métastases du cancer du sein dans le cerveau (221). Ces données suggèrent que STAUI participe à tous les stades du développement tumoral, entres autres le stade prolifératif et métastatique, par divers mécanismes qui sont encore à élucider.

3.4.3. Le SMD, un cheval de Troie pour les voies oncogènes : cas du cancer gastrique

À la différence du cancer colorectal et des rhabdomyosarcomes, où les niveaux d'expression de STAUI sont respectivement diminués et augmentés, le cancer gastrique (GC) ne présente aucune altération au niveau de son expression. Pourtant le SMD se trouve au centre d'une multitude de mécanismes d'action pro-prolifératifs dans les cellules GC, impliquant notamment les Longs ARN non codants qui vont recruter STAUI pour dégrader leur cibles anti-prolifération (224, 225, 228). Après examen des mécanismes qui impliquent le SMD dans le maintien du potentiel prolifératif des cellules GC (détaillés à la section 1.3.10), il convient de dire que le SMD est une voie « prise en otage », accaparée ou plutôt utilisée comme un cheval de Troie par les voies oncogènes tel que l'axe E2F1/TINCR, E2F1/HOXA11-AS ou SP1/TINCR. Ces voies impliquent généralement un tandem formé par un facteur de transcription fortement exprimé dans les cellules cancéreuses et un Long ARN non codant dont l'expression est régulée par ce même facteur d'expression. Les cibles du SMD dans ce contexte sont directement ou indirectement impliquées dans l'inhibition du cycle cellulaire. La manière dont les voies de fonctionnement de STAUI sont infiltrées par les tandems oncogènes nous rappelle également les mécanismes par lesquels Staufen1 participe au processus d'infection et de réplication virale (213, 240-243).

3.4.4. Staufen1 intervient dans les processus de développement tumoral : un modèle à trois dimensions

En moins de quatre années, neuf études publiées sur STAUI, suggèrent, ou démontrent, son implication dans plusieurs processus qui régulent le développement tumoral. La synthèse des données issues de tous ces travaux nous permet de définir trois types de représentations que STAUI pourrait avoir dans les différents types de cancer (figure) : **1- Staufen1 connaît une perte de fonction.** Dans ce cas, on peut parler d'une voie anti-tumorale. Cette perte de fonction, rapportée par notre laboratoire (244) et par d'autres (223), a été particulièrement étudiée dans le cas du cancer colorectal. Par ailleurs, nos résultats montrent que la surexpression de STAUI induit une diminution significative de la prolifération, également dans les cellules de l'ostéosarcome U2OS, ainsi que les cellules

transformées du rein HEK293T. Il serait intéressant d'approfondir les investigations sur le rôle de STAU1 dans le développement tumoral, au sein des tissus correspondants. **2- Staufen1 connaît un gain de fonction.** Dans ce cas, on peut parler d'une voie oncogène. Ce gain de fonction de Staufen1 a été particulièrement rapporté dans les deux sous-types, embryonnaires et alvéolaires du rhabdomyosarcome. En effet, Jasmin et ses collègues rapportent une augmentation significative de l'expression de STAU1, tant au niveau transcriptionnel que protéique, dans les lignées et les tissus cancéreux par rapport aux contrôles (226). Cette surexpression se traduit par des effets importants sur les potentiels prolifératif, anti-apoptotique et métastatique de ce type de tumeurs. Sur le plan mécanistique, beaucoup reste à découvrir quant aux fonctions moléculaires de Staufen1 qui assurent la survie et activent les voies de la migration et de l'invasion cellulaires. **3- Staufen1 est un cheval de Troie** utilisé par les voies oncogènes pour infiltrer le SMD et développer le potentiel prolifératif des cellules tumorales. Dans ce cas, l'expression de STAU1 n'est affectée à aucun niveau dans le processus de la carcinogenèse. Pourtant, comme dans le cas du cancer gastrique, le SMD se trouve au centre d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnel recruté et mobilisé par différents LncRNA, pour cibler les voies inhibitrices de la prolifération (224, 225, 228).

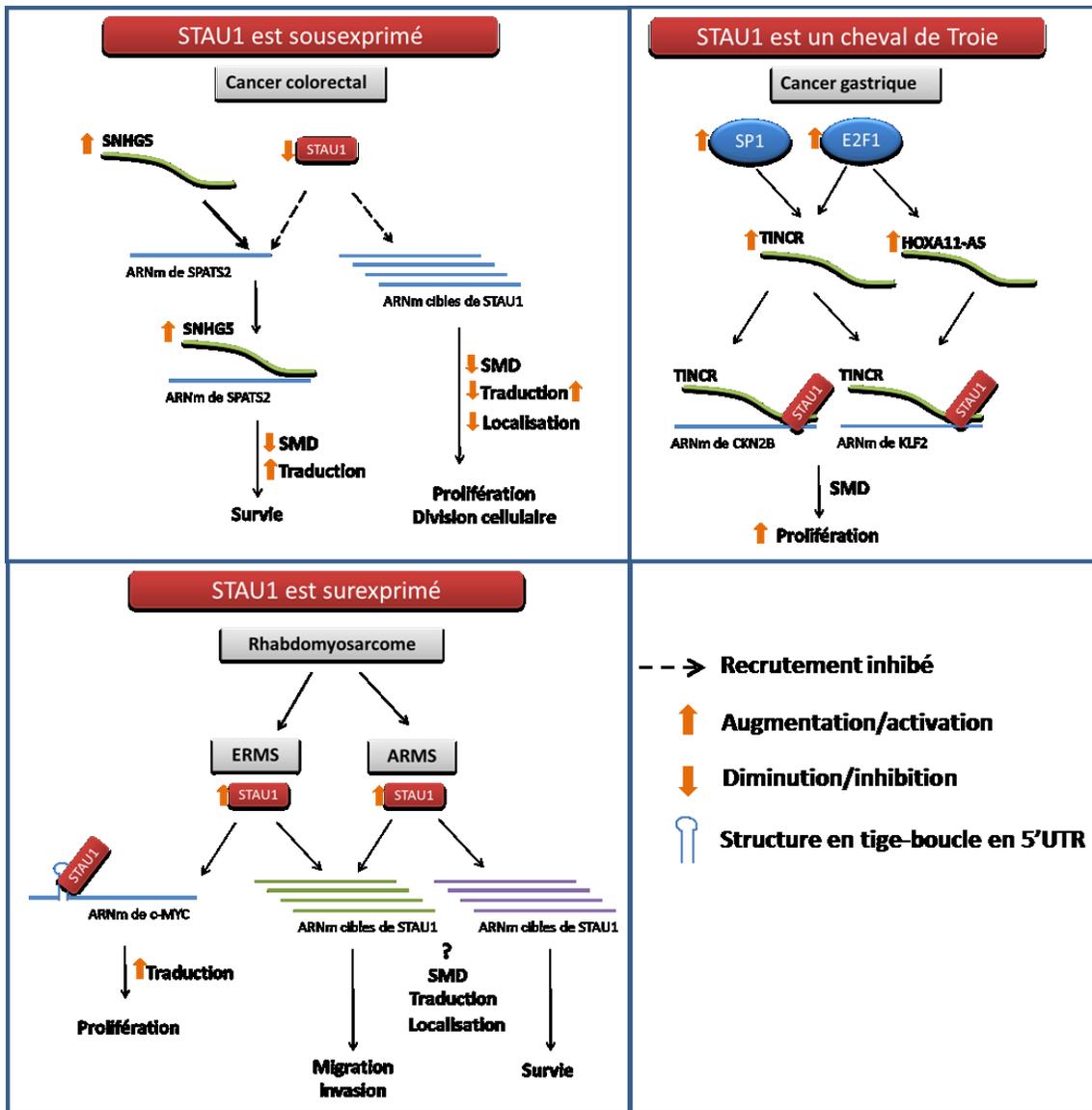


Figure 2. Schéma explicatif de l'implication de Staufen1 dans les différents processus de la tumorigenèse.

La base de données Oncomine de Thermo Fisher répertorie les études d'expression d'une infinité de gènes, et dans une multitude de tissus et types cellulaires. Elle offre également des outils pour réaliser des comparaisons entre tissus cancéreux et tissus normaux, ou même entre différents types de cancer. La compilation des données sur l'expression différentielle de Staufen1 dans les différents types de cancers suggère une variabilité dans les niveaux d'expression d'un type de cancer à un autre et même pour le même type de cancer. Par ailleurs, un grand nombre d'études sur le profil d'expression des gènes pour diverses

tumeurs montre une invariabilité des niveaux transcriptionnels de STAU1, renforçant le modèle d'implication multiple de STAU1, et particulièrement une mobilisation de STAU1 par les voies oncogènes, sans influence sur son abondance dans la cellule (245).

Conclusion

Les travaux de recherche entrepris dans le cadre de cette thèse ont contribué à approfondir nos connaissances sur le rôle de la protéine Staufen1 dans la régulation post-transcriptionnelle du cycle cellulaire et de la prolifération. En l'occurrence, nous avons identifié un nouveau mécanisme de dégradation de STAU1 en sortie de mitose, impliquant le système ubiquitine-protéasome. Nous avons également montré pour la première fois que STAU1 pourrait inhiber la prolifération tumorale dans le cas du cancer colorectal, et les résultats de nos travaux ont été confirmés et approfondies dans des études ultérieures. Par ailleurs, les résultats de nos approches expérimentales, en vue de l'étude de l'impact de STAU1 sur le contrôle de la prolifération dans des modèles cellulaires non transformés suggèrent fortement un rôle positif dans le développement du potentiel prolifératif en cas de transformation tumorale. Ces résultats sont en harmonie avec une multitude d'études portant sur le rôle positif de STAU1 dans la régulation de la prolifération et sur son implication dans divers types de cancers. Cependant, l'examen, plus exhaustif des études portant sur Staufen1 suggère un modèle multi-mécanistique dans les divers processus carcinogènes, et ouvre un champ d'investigation futur d'une grande ampleur pour élucider les mécanismes moléculaires qui soutiennent les fonctions STAU1 associés à la prolifération cellulaire et le développement tumoral.

Références

1. Sorbonne-Université Sciences. Ressources numérique pour l'enseignement en biologie RN'bio 2018 [cited 2018 08-11]. Available from: <https://rnbio.upmc.fr>.
2. Cooper S. The continuum model and c-myc synthesis during the division cycle. *J Theor Biol.* 1988 Dec 7;135(3):393-400. PubMed PMID: 3256727. Epub 1988/12/07. eng.
3. Pellicciari C, Mangiarotti R, Bottone MG, Danova M, Wang E. Identification of resting cells by dual-parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry.* 1995 Dec 1;21(4):329-37. PubMed PMID: 8608730. Epub 1995/12/01. eng.
4. Eddaoudi A, Canning SL, Kato I. Flow Cytometric Detection of G0 in Live Cells by Hoechst 33342 and Pyronin Y Staining. *Methods Mol Biol.* 2018;1686:49-57. PubMed PMID: 29030811. Epub 2017/10/17. eng.
5. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Apr;71(4):1286-90. PubMed PMID: 4524638. Pubmed Central PMCID: PMC388211. Epub 1974/04/01. eng.
6. Pardee AB. Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. *J Pathol.* 1986 May;149(1):1-2. PubMed PMID: 3723223. Epub 1986/05/01. eng.
7. Temin HM. Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells. *J Cell Physiol.* 1971 Oct;78(2):161-70. PubMed PMID: 5167847. Epub 1971/10/01. eng.
8. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Dec;7(6):835-42. PubMed PMID: 8608014. Epub 1995/12/01. eng.
9. Sorbonne Université Sciences. Le passage du point de restriction nécessite la présence de facteurs de croissance. 2018. Available from: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia>.
10. Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet.* 2008 Nov;9(11):843-54. PubMed PMID: 18927579. Pubmed Central PMCID: PMC2715827. Epub 2008/10/18. eng.
11. Jeppsson K, Kanno T, Shirahige K, Sjogren C. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Sep;15(9):601-14. PubMed PMID: 25145851. Epub 2014/08/26. eng.
12. Doenecke D. Chromatin dynamics from S-phase to mitosis: contributions of histone modifications. *Cell Tissue Res.* 2014 Jun;356(3):467-75. PubMed PMID: 24816984. Epub 2014/05/13. eng.
13. Arizona State University ASU. La mitose [Figure]. 2018. Available from: <https://askabiologist.asu.edu>.
14. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* 1994 Nov 18;79(4):573-82. PubMed PMID: 7954824. Epub 1994/11/18. eng.
15. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:441-70. PubMed PMID: 1497317. Epub 1992/01/01. eng.
16. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):131-4. PubMed PMID: 7877684. Epub 1995/03/09. eng.
17. Elledge SJ, Harper JW. The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Apr 17;1377(2):M61-70. PubMed PMID: 9606978. Epub 1998/06/02. eng.

18. Sanchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Jun;16(3):311-21. PubMed PMID: 15840440. Epub 2005/04/21. eng.
19. Xiong Y. Why are there so many CDK inhibitors? *Biochim Biophys Acta.* 1996 Aug 8;1288(1):01-5. PubMed PMID: 8764842. Epub 1996/08/08. eng.
20. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999 Jun 15;13(12):1501-12. PubMed PMID: 10385618. Epub 1999/07/01. eng.
21. Meijer L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie.* 2003;5:311--26.
22. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995 May 5;81(3):323-30. PubMed PMID: 7736585. Epub 1995/05/05. eng.
23. Vlach J, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* 1997 Sep 1;16(17):5334-44. PubMed PMID: 9311993. Pubmed Central PMCID: PMC1170165. Epub 1997/10/06. eng.
24. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature.* 1995 Jul 27;376(6538):313-20. PubMed PMID: 7630397. Epub 1995/07/27. eng.
25. Honda R, Lowe ED, Dubinina E, Skamnaki V, Cook A, Brown NR, et al. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J.* 2005 Feb 9;24(3):452-63. PubMed PMID: 15660127. Pubmed Central PMCID: PMC548659. Epub 2005/01/22. eng.
26. Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol.* 1996 Aug;3(8):696-700. PubMed PMID: 8756328. Epub 1996/08/01. eng.
27. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:261-91. PubMed PMID: 9442875. Epub 1997/01/01. eng.
28. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Apr;18(2):185-91. PubMed PMID: 16488126. Epub 2006/02/21. eng.
29. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 1995 Jun;17(6):471-80. PubMed PMID: 7575488. Epub 1995/06/01. eng.
30. Peeper DS, Parker LL, Ewen ME, Toebes M, Hall FL, Xu M, et al. A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 1993 May;12(5):1947-54. PubMed PMID: 8491188. Pubmed Central PMCID: PMC413416. Epub 1993/05/01. eng.
31. Cuomo ME, Platt GM, Pearl LH, Mittnacht S. Cyclin-cyclin-dependent kinase regulatory response is linked to substrate recognition. *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):9713-25. PubMed PMID: 21233209. Pubmed Central PMCID: PMC3059039. Epub 2011/01/15. eng.
32. Zhu L, Harlow E, Dynlacht BD. p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes Dev.* 1995 Jul 15;9(14):1740-52. PubMed PMID: 7622038. Epub 1995/07/15. eng.
33. Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG, Jr. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol.* 1996 Dec;16(12):6623-33. PubMed PMID: 8943316. Pubmed Central PMCID: PMC231664. Epub 1996/12/01. eng.

34. Takeda DY, Wohlschlegel JA, Dutta A. A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):1993-7. PubMed PMID: 11067844. Epub 2000/11/09. eng.
35. Ghram M. Rôle de la déubiquitinase BAP1 dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN: Université de Montréal; 2010.
36. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jan;6(1):9-20. PubMed PMID: 15688063. Epub 2005/02/03. eng.
37. Bassermann F, Eichner R, Pagano M. The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1843(1):150-62. PubMed PMID: 23466868. Pubmed Central PMCID: PMC3694769. Epub 2013/03/08. eng.
38. Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, et al. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell.* 1996 Jul 26;86(2):263-74. PubMed PMID: 8706131. Epub 1996/07/26. eng.
39. Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* 2004 Nov 1;18(21):2573-80. PubMed PMID: 15520277. Pubmed Central PMCID: PMC525538. Epub 2004/11/03. eng.
40. Skaar JR, Pagano M. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec;21(6):816-24. PubMed PMID: 19775879. Pubmed Central PMCID: PMC2805079. Epub 2009/09/25. eng.
41. Silverman JS, Skaar JR, Pagano M. SCF ubiquitin ligases in the maintenance of genome stability. *Trends Biochem Sci.* 2012 Feb;37(2):66-73. PubMed PMID: 22099186. Pubmed Central PMCID: PMC3278546. Epub 2011/11/22. eng.
42. van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1786(1):49-59. PubMed PMID: 18544349. Epub 2008/06/12. eng.
43. Li M, Zhang P. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. *Cell division.* 2009 Jan 19;4:2. PubMed PMID: 19152694. Pubmed Central PMCID: PMC2635356. Epub 2009/01/21. eng.
44. Meszaros B, Kumar M, Gibson TJ, Uyar B, Dosztanyi Z. Degrons in cancer. *Science signaling.* 2017 Mar 14;10(470). PubMed PMID: 28292960. Epub 2017/03/16. eng.
45. Mailand N, Diffley JF. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell.* 2005 Sep 23;122(6):915-26. PubMed PMID: 16153703. Epub 2005/09/13. eng.
46. Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, et al. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem.* 1995 Oct 6;270(40):23589-97. PubMed PMID: 7559524. Epub 1995/10/06. eng.
47. Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG, Jr. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature.* 2004 Mar 11;428(6979):194-8. PubMed PMID: 15014503. Epub 2004/03/12. eng.
48. Donzelli M, Squatrito M, Ganoth D, Hershko A, Pagano M, Draetta GF. Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J.* 2002 Sep 16;21(18):4875-84. PubMed PMID: 12234927. Pubmed Central PMCID: PMC126287. Epub 2002/09/18. eng.
49. Skaar JR, Pagano M. Cdh1: a master G0/G1 regulator. *Nat Cell Biol.* 2008 Jul;10(7):755-7. PubMed PMID: 18591966. Pubmed Central PMCID: PMC2730193. Epub 2008/07/02. eng.

50. Lindon C, Pines J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol.* 2004 Jan 19;164(2):233-41. PubMed PMID: 14734534. Pubmed Central PMCID: PMC2172335. Epub 2004/01/22. eng.
51. Stewart S, Fang G. Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res.* 2005 Oct 1;65(19):8730-5. PubMed PMID: 16204042. Epub 2005/10/06. eng.
52. Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, Labbe JC, Prigent C, Lorca T. APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO reports.* 2002 May;3(5):457-62. PubMed PMID: 11964384. Pubmed Central PMCID: PMC1084108. Epub 2002/04/20. eng.
53. Zhou Z, He M, Shah AA, Wan Y. Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell division.* 2016;11:9. PubMed PMID: 27418942. Pubmed Central PMCID: PMC4944252. Epub 2016/07/16. eng.
54. Fernandez-Saiz V, Targosz BS, Lemeer S, Eichner R, Langer C, Bullinger L, et al. SCFFbxo9 and CK2 direct the cellular response to growth factor withdrawal via Tel2/Tti1 degradation and promote survival in multiple myeloma. *Nat Cell Biol.* 2013 Jan;15(1):72-81. PubMed PMID: 23263282. Epub 2012/12/25. eng.
55. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science.* 2006 Oct 20;314(5798):467-71. PubMed PMID: 17053147. Epub 2006/10/21. eng.
56. Dehan E, Bassermann F, Guardavaccaro D, Vasiliver-Shamis G, Cohen M, Lowes KN, et al. betaTrCP- and Rsk1/2-mediated degradation of BimEL inhibits apoptosis. *Mol Cell.* 2009 Jan 16;33(1):109-16. PubMed PMID: 19150432. Pubmed Central PMCID: PMC2655121. Epub 2009/01/20. eng.
57. Gao D, Inuzuka H, Tan MK, Fukushima H, Locasale JW, Liu P, et al. mTOR drives its own activation via SCF(betaTrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Mol Cell.* 2011 Oct 21;44(2):290-303. PubMed PMID: 22017875. Pubmed Central PMCID: PMC3229299. Epub 2011/10/25. eng.
58. Rape M, Kirschner MW. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature.* 2004 Dec 2;432(7017):588-95. PubMed PMID: 15558010. Epub 2004/11/24. eng.
59. Listovsky T, Oren YS, Yudkovsky Y, Mahbubani HM, Weiss AM, Lebendiker M, et al. Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *EMBO J.* 2004 Apr 7;23(7):1619-26. PubMed PMID: 15029244. Pubmed Central PMCID: PMC391060. Epub 2004/03/19. eng.
60. Miller JJ, Summers MK, Hansen DV, Nachury MV, Lehman NL, Loktev A, et al. Emil stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev.* 2006 Sep 1;20(17):2410-20. PubMed PMID: 16921029. Pubmed Central PMCID: PMC1560415. Epub 2006/08/22. eng.
61. Nakayama KI, Nakayama K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Jun;16(3):323-33. PubMed PMID: 15840441. Epub 2005/04/21. eng.
62. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.* 1999 Aug;1(4):193-9. PubMed PMID: 10559916. Epub 1999/11/13. eng.

63. Hershko DD. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer*. 2008 Apr 1;112(7):1415-24. PubMed PMID: 18260093. Epub 2008/02/09. eng.
64. Lin DI, Barbash O, Kumar KG, Weber JD, Harper JW, Klein-Szanto AJ, et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. *Mol Cell*. 2006 Nov 3;24(3):355-66. PubMed PMID: 17081987. Pubmed Central PMCID: PMC1702390. Epub 2006/11/04. eng.
65. Koepf DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*. 2001 Oct 5;294(5540):173-7. PubMed PMID: 11533444. Epub 2001/09/05. eng.
66. Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, et al. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):87-91. PubMed PMID: 14603323. Epub 2003/11/07. eng.
67. Bassermann F, Pagano M. Dissecting the role of ubiquitylation in the DNA damage response checkpoint in G2. *Cell Death Differ*. 2010 Jan;17(1):78-85. PubMed PMID: 19680264. Epub 2009/08/15. eng.
68. D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, et al. Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1023-34. PubMed PMID: 22632967. Pubmed Central PMCID: PMC3616325. Epub 2012/05/29. eng.
69. Choudhury R, Bonacci T, Wang X, Truong A, Arceci A, Zhang Y, et al. The E3 Ubiquitin Ligase SCF(Cyclin F) Transmits AKT Signaling to the Cell-Cycle Machinery. *Cell reports*. 2017 Sep 26;20(13):3212-22. PubMed PMID: 28954236. Pubmed Central PMCID: PMC5662023. Epub 2017/09/28. eng.
70. D'Angiolella V, Donato V, Vijayakumar S, Saraf A, Florens L, Washburn MP, et al. SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature*. 2010 Jul 1;466(7302):138-42. PubMed PMID: 20596027. Pubmed Central PMCID: PMC2946399. Epub 2010/07/03. eng.
71. Bassermann F, von Klitzing C, Munch S, Bai RY, Kawaguchi H, Morris SW, et al. NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):45-57. PubMed PMID: 16009132. Epub 2005/07/13. eng.
72. Illert AL, Zech M, Moll C, Albers C, Kreutmair S, Peschel C, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) mediates phosphorylation and inactivation of nuclear interaction partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA) at G2/M. *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):37997-8005. PubMed PMID: 22955283. Pubmed Central PMCID: PMC3488070. Epub 2012/09/08. eng.
73. Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JD, Jackson PK. Prophase destruction of Emil by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell*. 2003 Jun;4(6):813-26. PubMed PMID: 12791267. Epub 2003/06/07. eng.
74. Braunstein I, Miniowitz S, Moshe Y, Hershko A. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):4870-5. PubMed PMID: 17360335. Pubmed Central PMCID: PMC1829231. Epub 2007/03/16. eng.

75. Ge S, Skaar JR, Pagano M. APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009 Jan 1;8(1):167-71. PubMed PMID: 19098431. Pubmed Central PMCID: PMC2703714. Epub 2008/12/23. eng.
76. Guardavaccaro D, Frescas D, Dorrello NV, Peschiaroli A, Multani AS, Cardozo T, et al. Control of chromosome stability by the β -TrCP–REST–Mad2 axis. *Nature*. 2008 Mar 20;452(7185):365-9. PubMed PMID: 18354482.
77. Amador V, Ge S, Santamaria PG, Guardavaccaro D, Pagano M. APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell*. 2007 Aug 3;27(3):462-73. PubMed PMID: 17679094. Pubmed Central PMCID: PMC2000825. Epub 2007/08/07. eng.
78. Reis A, Levasseur M, Chang HY, Elliott DJ, Jones KT. The CRY box: a second APCcdh1-dependent degron in mammalian cdc20. *EMBO reports*. 2006 Oct;7(10):1040-5. PubMed PMID: 16878123. Pubmed Central PMCID: PMC1618383. Epub 2006/08/01. eng.
79. Pflieger CM, Kirschner MW. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev*. 2000 Mar 15;14(6):655-65. PubMed PMID: 10733526. Pubmed Central PMCID: PMC316466. Epub 2000/03/25. eng.
80. Hayes MJ, Kimata Y, Wattam SL, Lindon C, Mao G, Yamano H, et al. Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol*. 2006 Jun;8(6):607-14. PubMed PMID: 16648845. Epub 2006/05/02. eng.
81. Di Fiore B, Pines J. How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 2010 Aug 23;190(4):501-9. PubMed PMID: 20733051. Pubmed Central PMCID: PMC2928024. Epub 2010/08/25. eng.
82. Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):644-56. PubMed PMID: 16896351. Epub 2006/08/10. eng.
83. Hauf S, Waizenegger IC, Peters JM. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*. 2001 Aug 17;293(5533):1320-3. PubMed PMID: 11509732. Epub 2001/08/18. eng.
84. den Elzen N, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol*. 2001 Apr 2;153(1):121-36. PubMed PMID: 11285279. Pubmed Central PMCID: PMC2185531. Epub 2001/04/04. eng.
85. Raff JW, Jeffers K, Huang JY. The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *J Cell Biol*. 2002 Jun 24;157(7):1139-49. PubMed PMID: 12082076. Pubmed Central PMCID: PMC2173543. Epub 2002/06/26. eng.
86. McGarry TJ, Kirschner MW. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*. 1998 Jun 12;93(6):1043-53. PubMed PMID: 9635433. Epub 1998/07/11. eng.
87. Kramer ER, Scheuringer N, Podtelejnikov AV, Mann M, Peters JM. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell*. 2000 May;11(5):1555-69. PubMed PMID: 10793135. Pubmed Central PMCID: PMC14867. Epub 2000/05/04. eng.
88. Varetto G, Guida C, Santaguida S, Chirolì E, Musacchio A. Homeostatic control of mitotic arrest. *Mol Cell*. 2011 Dec 9;44(5):710-20. PubMed PMID: 22152475. Epub 2011/12/14. eng.
89. Alfieri C, Zhang S, Barford D. Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open biology*. 2017 Nov;7(11). PubMed PMID: 29167309. Pubmed Central PMCID: PMC5717348. Epub 2017/11/24. eng.

90. Fischer M, Muller GA. Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2017 Dec;52(6):638-62. PubMed PMID: 28799433. Epub 2017/08/12. eng.
91. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene.* 2005 Apr 18;24(17):2796-809. PubMed PMID: 15838516. Epub 2005/04/20. eng.
92. Gaubatz S, Wood JG, Livingston DM. Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9190-5. PubMed PMID: 9689056. Pubmed Central PMCID: PMC21314. Epub 1998/08/05. eng.
93. Whitfield ML, Zheng LX, Baldwin A, Ohta T, Hurt MM, Marzluff WF. Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2000 Jun;20(12):4188-98. PubMed PMID: 10825184. Pubmed Central PMCID: PMC85788. Epub 2000/05/29. eng.
94. Polymenis M, Schmidt EV. Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev.* 1997 Oct 1;11(19):2522-31. PubMed PMID: 9334317. Pubmed Central PMCID: PMC316559. Epub 1997/10/23. eng.
95. Millard SS, Vidal A, Markus M, Koff A. A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):5947-59. PubMed PMID: 10913178. Pubmed Central PMCID: PMC86072. Epub 2000/07/27. eng.
96. Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7093-8. PubMed PMID: 9054402. Epub 1997/03/14. eng.
97. Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, Beyaert R. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell.* 2000 Apr;5(4):597-605. PubMed PMID: 10882096. Epub 2000/07/06. eng.
98. Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques. Initiation canonique de la traduction dite coiffe-dépendante 2018. Available from: <http://lcrbw.pharmacie.univ-paris5.fr/spip.php?rubrique39>.
99. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature.* 2005 Feb 3;433(7025):477-80. PubMed PMID: 15690031. Epub 2005/02/04. eng.
100. Pyronnet S, Sonenberg N. Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Feb;11(1):13-8. PubMed PMID: 11163145. Epub 2001/02/13. eng.
101. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004 Aug 15;18(16):1926-45. PubMed PMID: 15314020. Epub 2004/08/18. eng.
102. Tarn WY, Lai MC. Translational control of cyclins. *Cell division.* 2011 Feb 11;6(1):5. PubMed PMID: 21314915. Pubmed Central PMCID: PMC3048474. Epub 2011/02/15. eng.
103. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-63. PubMed PMID: 10872469. Epub 2000/06/29. eng.
104. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsihchlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29864-72. PubMed PMID: 9792703. Epub 1998/10/29. eng.

105. Grant GD, Brooks L, 3rd, Zhang X, Mahoney JM, Martyanov V, Wood TA, et al. Identification of cell cycle-regulated genes periodically expressed in U2OS cells and their regulation by FOXM1 and E2F transcription factors. *Mol Biol Cell*. 2013 Dec;24(23):3634-50. PubMed PMID: 24109597. Pubmed Central PMCID: PMC3842991. Epub 2013/10/11. eng.
106. Nagano T, Lubling Y, Varnai C, Dudley C, Leung W, Baran Y, et al. Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature*. 2017 Jul 5;547(7661):61-7. PubMed PMID: 28682332. Pubmed Central PMCID: PMC5567812. Epub 2017/07/07. eng.
107. Proudfoot N, O'Sullivan J. Polyadenylation: a tail of two complexes. *Curr Biol*. 2002 Dec 23;12(24):R855-7. PubMed PMID: 12498707. Epub 2002/12/25. eng.
108. Gu M, Lima CD. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Feb;15(1):99-106. PubMed PMID: 15718140. Epub 2005/02/19. eng.
109. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Feb;15(2):108-21. PubMed PMID: 24452469. Pubmed Central PMCID: PMC4060434. Epub 2014/01/24. eng.
110. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome biology*. 2003;4(7):223. PubMed PMID: 12844354. Pubmed Central PMCID: PMC193625. Epub 2003/07/08. eng.
111. Schmidt MJ, Norbury CJ. Polyadenylation and beyond: emerging roles for noncanonical poly(A) polymerases. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2010 Jul-Aug;1(1):142-51. PubMed PMID: 21956911. Epub 2010/07/01. eng.
112. Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Feb;11(2):121-7. PubMed PMID: 14749774. Epub 2004/01/30. eng.
113. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*. 2012 Apr 13;336(6078):237-40. PubMed PMID: 22499947. Pubmed Central PMCID: PMC3971879. Epub 2012/04/14. eng.
114. Okamura M, Inose H, Masuda S. RNA Export through the NPC in Eukaryotes. *Genes*. 2015 Mar 20;6(1):124-49. PubMed PMID: 25802992. Pubmed Central PMCID: PMC4377836. Epub 2015/03/25. eng.
115. Mitchell SF, Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol Cell*. 2014 May 22;54(4):547-58. PubMed PMID: 24856220. Epub 2014/05/27. eng.
116. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):113-26. PubMed PMID: 17245413. Epub 2007/01/25. eng.
117. Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J*. 2000 Dec 15;19(24):6860-9. PubMed PMID: 11118221. Pubmed Central PMCID: PMC305905. Epub 2000/12/16. eng.
118. Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, et al. Binding of a novel SMG-1-Upfl-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upfl phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*. 2006 Feb 1;20(3):355-67. PubMed PMID: 16452507. Pubmed Central PMCID: PMC1361706. Epub 2006/02/03. eng.

119. Unterholzner L, Izaurralde E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell*. 2004 Nov 19;16(4):587-96. PubMed PMID: 15546618. Epub 2004/11/18. eng.
120. Choe J, Ahn SH, Kim YK. The mRNP remodeling mediated by UPF1 promotes rapid degradation of replication-dependent histone mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2014 Aug;42(14):9334-49. PubMed PMID: 25016523. Pubmed Central PMCID: PMC4132728. Epub 2014/07/14. eng.
121. Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):195-208. PubMed PMID: 15680326. Epub 2005/02/01. eng.
122. Passos DO, Doma MK, Shoemaker CJ, Muhlrud D, Green R, Weissman J, et al. Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Mol Biol Cell*. 2009 Jul;20(13):3025-32. PubMed PMID: 19420139. Pubmed Central PMCID: PMC2704154. Epub 2009/05/08. eng.
123. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J. [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*. 1960 Feb 29;250:1727-9. PubMed PMID: 14406329. Epub 1960/02/29. fre.
124. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*. 2007 Jul;8(7):533-43. PubMed PMID: 17572691. Epub 2007/06/19. eng.
125. Ray D, Kazan H, Cook KB, Weirauch MT, Najafabadi HS, Li X, et al. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*. 2013 Jul 11;499(7457):172-7. PubMed PMID: 23846655. Pubmed Central PMCID: PMC3929597. Epub 2013/07/13. eng.
126. Gao FB, Carson CC, Levine T, Keene JD. Selection of a subset of mRNAs from combinatorial 3' untranslated region libraries using neuronal RNA-binding protein Hel-N1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):11207-11. PubMed PMID: 7972035. Pubmed Central PMCID: PMC45196. Epub 1994/11/08. eng.
127. Tenenbaum SA, Carson CC, Lager PJ, Keene JD. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14085-90. PubMed PMID: 11121017. Pubmed Central PMCID: PMC18875. Epub 2000/12/20. eng.
128. Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J*. 2000 May 15;19(10):2340-50. PubMed PMID: 10811625. Pubmed Central PMCID: PMC384372. Epub 2000/05/16. eng.
129. Keene JD, Komisarow JM, Friedersdorf MB. RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nature protocols*. 2006;1(1):302-7. PubMed PMID: 17406249. Epub 2007/04/05. eng.
130. Imig J, Kanitz A, Gerber AP. RNA regulons and the RNA-protein interaction network. *Biomolecular concepts*. 2012 Oct;3(5):403-14. PubMed PMID: 25436546. Epub 2012/10/01. eng.
131. Chabot B. My road to alternative splicing control: from simple paths to loops and interconnections. *Biochem Cell Biol*. 2015 Jun;93(3):171-9. PubMed PMID: 25759250. Epub 2015/03/12. eng.
132. Siddiqui N, Borden KL. mRNA export and cancer. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2012 Jan-Feb;3(1):13-25. PubMed PMID: 21796793. Epub 2011/07/29. eng.

133. Jung H, Gkogkas CG, Sonenberg N, Holt CE. Remote control of gene function by local translation. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):26-40. PubMed PMID: 24679524. Pubmed Central PMCID: PMC3988848. Epub 2014/04/01. eng.
134. Lazaris-Karatzas A, Smith MR, Frederickson RM, Jaramillo ML, Liu YL, Kung HF, et al. Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation. *Genes Dev*. 1992 Sep;6(9):1631-42. PubMed PMID: 1516827. Epub 1992/09/01. eng.
135. Culjkovic B, Tan K, Orolicki S, Amri A, Meloche S, Borden KL. The eIF4E RNA regulon promotes the Akt signaling pathway. *J Cell Biol*. 2008 Apr 7;181(1):51-63. PubMed PMID: 18391071. Pubmed Central PMCID: PMC2287285. Epub 2008/04/09. eng.
136. Topisirovic I, Siddiqui N, Lapointe VL, Trost M, Thibault P, Bangeranye C, et al. Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J*. 2009 Apr 22;28(8):1087-98. PubMed PMID: 19262567. Pubmed Central PMCID: PMC2683702. Epub 2009/03/06. eng.
137. Fontoura BM, Blobel G, Matunis MJ. A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol*. 1999 Mar 22;144(6):1097-112. PubMed PMID: 10087256. Pubmed Central PMCID: PMC2150585. Epub 1999/03/24. eng.
138. Simon DN, Rout MP. Cancer and the nuclear pore complex. *Adv Exp Med Biol*. 2014;773:285-307. PubMed PMID: 24563353. Epub 2014/02/25. eng.
139. Wozniak RW, Goldfarb DS. Cyclin-like oscillations in levels of the nucleoporin Nup96 control G1/S progression. *Dev Cell*. 2008 Nov;15(5):643-4. PubMed PMID: 19000830. Epub 2008/11/13. eng.
140. Kalverda B, Pickersgill H, Shloma VV, Fornerod M. Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):360-71. PubMed PMID: 20144760. Epub 2010/02/11. eng.
141. Imamoto N, Funakoshi T. Nuclear pore dynamics during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Aug;24(4):453-9. PubMed PMID: 22770730. Epub 2012/07/10. eng.
142. Singer S, Zhao R, Barsotti AM, Ouwehand A, Fazollahi M, Coutavas E, et al. Nuclear pore component Nup98 is a potential tumor suppressor and regulates posttranscriptional expression of select p53 target genes. *Mol Cell*. 2012 Dec 14;48(5):799-810. PubMed PMID: 23102701. Pubmed Central PMCID: PMC3525737. Epub 2012/10/30. eng.
143. Takeda A, Yaseen NR. Nucleoporins and nucleocytoplasmic transport in hematologic malignancies. *Semin Cancer Biol*. 2014 Aug;27:3-10. PubMed PMID: 24657637. Epub 2014/03/25. eng.
144. Marzluff WF, Koreski KP. Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends Genet*. 2017 Oct;33(10):745-59. PubMed PMID: 28867047. Pubmed Central PMCID: PMC5645032. Epub 2017/09/05. eng.
145. Dutertre M, Lambert S, Carreira A, Amor-Gueret M, Vagner S. DNA damage: RNA-binding proteins protect from near and far. *Trends Biochem Sci*. 2014 Mar;39(3):141-9. PubMed PMID: 24534650. Epub 2014/02/19. eng.
146. Dutertre M, Vagner S. DNA-Damage Response RNA-Binding Proteins (DDRBP): Perspectives from a New Class of Proteins and Their RNA Targets. *J Mol Biol*. 2017 Oct 27;429(21):3139-45. PubMed PMID: 27693651. Epub 2016/10/04. eng.
147. Mazan-Mamczarz K, Hagner PR, Zhang Y, Dai B, Lehrmann E, Becker KG, et al. ATM regulates a DNA damage response posttranscriptional RNA operon in lymphocytes.

- Blood. 2011 Feb 24;117(8):2441-50. PubMed PMID: 21209379. Pubmed Central PMCID: PMC3062410. Epub 2011/01/07. eng.
148. Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*. 2007 Feb 23;25(4):543-57. PubMed PMID: 17317627. Pubmed Central PMCID: PMC1986740. Epub 2007/02/24. eng.
149. Ferrandon D, Elphick L, Nusslein-Volhard C, St Johnston D. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1221-32. PubMed PMID: 8001156. Epub 1994/12/30. eng.
150. St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell*. 1991 Jul 12;66(1):51-63. PubMed PMID: 1712672. Epub 1991/07/12. eng.
151. Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B. Identification of a novel homolog of the Drosophila staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics*. 1999 Nov 15;62(1):113-8. PubMed PMID: 10585778. Epub 1999/12/10. eng.
152. DesGroseillers L, Lemieux N. Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1996 Sep 15;36(3):527-9. PubMed PMID: 8884277. Epub 1996/09/15. eng.
153. Schupbach T, Wieschaus E. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of Drosophila. *Dev Biol*. 1986 Feb;113(2):443-8. PubMed PMID: 3081391. Epub 1986/02/01. eng.
154. Jansen RP, Niessing D. Assembly of mRNA-protein complexes for directional mRNA transport in eukaryotes--an overview. *Curr Protein Pept Sci*. 2012 Jun;13(4):284-93. PubMed PMID: 22708485. Pubmed Central PMCID: PMC3474952. Epub 2012/06/20. eng.
155. Gilles maillet. 2018 [2018]. Available from: http://gilles.maillet.free.fr/histoire/famille_bourgogne/famille_hohenstaufen.htm.
156. Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):2220-30. PubMed PMID: 10022909. Pubmed Central PMCID: PMC84015. Epub 1999/02/18. eng.
157. Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci*. 2002 Aug 15;115(Pt 16):3285-95. PubMed PMID: 12140260. Epub 2002/07/26. eng.
158. Ramasamy S, Wang H, Quach HN, Sampath K. Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Dev Biol*. 2006 Apr 15;292(2):393-406. PubMed PMID: 16513105. Epub 2006/03/04. eng.
159. Allison R, Czaplinski K, Git A, Adegbenro E, Stennard F, Houlston E, et al. Two distinct Staufen isoforms in Xenopus are vegetally localized during oogenesis. *RNA*. 2004 Nov;10(11):1751-63. PubMed PMID: 15496522. Pubmed Central PMCID: PMC1370663. Epub 2004/10/22. eng.
160. Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA*. 2008 Feb;14(2):324-35. PubMed PMID: 18094122. Pubmed Central PMCID: PMC2212254. Epub 2007/12/21. eng.

161. Monshausen M, Gehring NH, Kosik KS. The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular Med.* 2004;6(2-3):127-44. PubMed PMID: 15970630. Epub 2005/06/23. eng.
162. Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2212-9. PubMed PMID: 10022908. Pubmed Central PMCID: PMC84014. Epub 1999/02/18. eng.
163. Tosar LJ, Thomas MG, Baez MV, Ibanez I, Chernomoretz A, Boccaccio GL. Staufen: from embryo polarity to cellular stress and neurodegeneration. *Frontiers in bioscience (Scholar edition).* 2012;4:432-52. PubMed PMID: 22202069. Epub 2011/12/29. eng.
164. Martel C, Macchi P, Furic L, Kiebler MA, Desgroseillers L. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J.* 2006 Jan 1;393(Pt 1):245-54. PubMed PMID: 16162096. Pubmed Central PMCID: PMC1383683. Epub 2005/09/16. eng.
165. Banerjee S, Barraud P. Functions of double-stranded RNA-binding domains in nucleocytoplasmic transport. *RNA biology.* 2014;11(10):1226-32. PubMed PMID: 25584639. Pubmed Central PMCID: PMC4615638. Epub 2015/01/15. eng.
166. Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 1999 Sep;10(9):2945-53. PubMed PMID: 10473638. Pubmed Central PMCID: PMC25535. Epub 1999/09/03. eng.
167. Kiebler MAH, I. ; Verkade, P. ; Köhrmann, M. ; Fortes, P. ; Marión, R. M. ; Ortín, J. ; Dotti, C. G. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci.* 1999 Janvier;19:288-97.
168. Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(15):4797-812. PubMed PMID: 16126845. Pubmed Central PMCID: PMC1193567. Epub 2005/08/30. eng.
169. Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, DesGroseillers L, Maquat LE. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J.* 2007 Jun 6;26(11):2670-81. PubMed PMID: 17510634. Pubmed Central PMCID: PMC1888674. Epub 2007/05/19. eng.
170. Wheeler TM, Thornton CA. Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease. *Curr Opin Neurol.* 2007 Oct;20(5):572-6. PubMed PMID: 17885447. Epub 2007/09/22. eng.
171. Lee JE, Cooper TA. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans.* 2009 Dec;37(Pt 6):1281-6. PubMed PMID: 19909263. Pubmed Central PMCID: PMC3873089. Epub 2009/11/17. eng.
172. Osborne RJ, Lin X, Welle S, Sobczak K, O'Rourke JR, Swanson MS, et al. Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009 Apr 15;18(8):1471-81. PubMed PMID: 19223393. Pubmed Central PMCID: PMC2664149. Epub 2009/02/19. eng.
173. Kuyumcu-Martinez NM, Cooper TA. Misregulation of alternative splicing causes pathogenesis in myotonic dystrophy. *Prog Mol Subcell Biol.* 2006;44:133-59. PubMed PMID: 17076268. Pubmed Central PMCID: PMC4127983. Epub 2006/11/02. eng.

174. Ravel-Chapuis A, Belanger G, Yadava RS, Mahadevan MS, DesGroseillers L, Cote J, et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J Cell Biol.* 2012 Mar 19;196(6):699-712. PubMed PMID: 22431750. Pubmed Central PMCID: PMC3308689. Epub 2012/03/21. eng.
175. Ravel-Chapuis A, Klein Gunnewiek A, Belanger G, Crawford Parks TE, Cote J, Jasmin BJ. Staufen1 impairs stress granule formation in skeletal muscle cells from myotonic dystrophy type 1 patients. *Mol Biol Cell.* 2016 Jun 1;27(11):1728-39. PubMed PMID: 27030674. Pubmed Central PMCID: PMC4884064. Epub 2016/04/01. eng.
176. Bondy-Chorney E, Crawford Parks TE, Ravel-Chapuis A, Klinck R, Rocheleau L, Pelchat M, et al. Staufen1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier. *PLoS Genet.* 2016 Jan;12(1):e1005827. PubMed PMID: 26824521. Pubmed Central PMCID: PMC4733145. Epub 2016/01/30. eng.
177. Morriss GR, Cooper TA. Protein sequestration as a normal function of long noncoding RNAs and a pathogenic mechanism of RNAs containing nucleotide repeat expansions. *Hum Genet.* 2017 Sep;136(9):1247-63. PubMed PMID: 28484853. Pubmed Central PMCID: PMC5677592. Epub 2017/05/10. eng.
178. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature.* 2011 Feb 10;470(7333):284-8. PubMed PMID: 21307942. Pubmed Central PMCID: PMC3073508. Epub 2011/02/11. eng.
179. Gong C, Tang Y, Maquat LE. mRNA-mRNA duplexes that autoelicit Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Oct;20(10):1214-20. PubMed PMID: 24056942. Pubmed Central PMCID: PMC3947523. Epub 2013/09/24. eng.
180. Park E, Gleghorn ML, Maquat LE. 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.* 2013 Jan 8;110(2):405-12. PubMed PMID: 23263869. Pubmed Central PMCID: PMC3545820. Epub 2012/12/25. eng.
181. Cho H, Kim KM, Han S, Choe J, Park SG, Choi SS, et al. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Mol Cell.* 2012 May 25;46(4):495-506. PubMed PMID: 22503102. Epub 2012/04/17. eng.
182. Franks TM, Singh G, Lykke-Andersen J. Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell.* 2010 Dec 10;143(6):938-50. PubMed PMID: 21145460. Pubmed Central PMCID: PMC3357093. Epub 2010/12/15. eng.
183. Park E, Maquat LE. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley interdisciplinary reviews RNA.* 2013 Jul-Aug;4(4):423-35. PubMed PMID: 23681777. Pubmed Central PMCID: PMC3711692. Epub 2013/05/18. eng.
184. Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev.* 2009 Jan 1;23(1):54-66. PubMed PMID: 19095803. Pubmed Central PMCID: PMC2632170. Epub 2008/12/20. eng.
185. Cho H, Kim KM, Kim YK. Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. *Mol Cell.* 2009 Jan 16;33(1):75-86. PubMed PMID: 19150429. Epub 2009/01/20. eng.
186. Simone TM, Higgins CE, Czekay RP, Law BK, Higgins SP, Archambeault J, et al. SERPINE1: A Molecular Switch in the Proliferation-Migration Dichotomy in Wound-

- "Activated" Keratinocytes. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Mar 1;3(3):281-90. PubMed PMID: 24669362. Pubmed Central PMCID: PMC3955966. Epub 2014/03/29. eng.
187. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015 Jan 5;5(1):a023267. PubMed PMID: 25561722. Pubmed Central PMCID: PMC4292081. Epub 2015/01/07. eng.
188. Providence KM, Higgins SP, Mullen A, Battista A, Samarakoon R, Higgins CE, et al. SERPINE1 (PAI-1) is deposited into keratinocyte migration "trails" and required for optimal monolayer wound repair. *Arch Dermatol Res*. 2008 Jul;300(6):303-10. PubMed PMID: 18386027. Pubmed Central PMCID: PMC2628461. Epub 2008/04/04. eng.
189. Zhang J, Liu X, Datta A, Govindarajan K, Tam WL, Han J, et al. RCP is a human breast cancer-promoting gene with Ras-activating function. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(8):2171-83. PubMed PMID: 19620787. Pubmed Central PMCID: PMC2719918. Epub 2009/07/22. eng.
190. Epstein JA, Lam P, Jepeal L, Maas RL, Shapiro DN. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J Biol Chem*. 1995 May 19;270(20):11719-22. PubMed PMID: 7744814. Epub 1995/05/19. eng.
191. Ravel-Chapuis A, Crawford TE, Blais-Crepeau ML, Belanger G, Richer CT, Jasmin BJ. The RNA-binding protein Staufen1 impairs myogenic differentiation via a c-myc-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2014 Nov 15;25(23):3765-78. PubMed PMID: 25208565. Pubmed Central PMCID: PMC4230783. Epub 2014/09/12. eng.
192. de Morree A, van Velthoven CTJ, Gan Q, Salvi JS, Klein JDD, Akimenko I, et al. Staufen1 inhibits MyoD translation to actively maintain muscle stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Oct 24;114(43):E8996-E9005. PubMed PMID: 29073096. Pubmed Central PMCID: PMC5664522. Epub 2017/10/27. eng.
193. McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clinics in liver disease*. 2014 Feb;18(1):41-58. PubMed PMID: 24274864. Epub 2013/11/28. eng.
194. Zhou D, Shen R, Ye JJ, Li Y, Tsark W, Isbell D, et al. Nuclear receptor coactivator PNRC2 regulates energy expenditure and adiposity. *J Biol Chem*. 2008 Jan 4;283(1):541-53. PubMed PMID: 17971453. Epub 2007/11/01. eng.
195. Nicholson P, Gkratsou A, Josi C, Colombo M, Muhlemann O. Dissecting the functions of SMG5, SMG7, and PNRC2 in nonsense-mediated mRNA decay of human cells. *RNA*. 2018 Apr;24(4):557-73. PubMed PMID: 29348139. Pubmed Central PMCID: PMC5855955. Epub 2018/01/20. eng.
196. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Dec;7(12):885-96. PubMed PMID: 17139329. Epub 2006/12/02. eng.
197. Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(5):1233-43. PubMed PMID: 7962086. Pubmed Central PMCID: PMC2120260. Epub 1994/12/01. eng.
198. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 26;102(17):6207-12. PubMed PMID: 15833818. Pubmed Central PMCID: PMC556131. Epub 2005/04/19. eng.
199. Funikov SY, Zatcepin OG. [Regulation of microRNA Activity in Stress]. *Mol Biol (Mosk)*. 2017 Jul-Aug;51(4):561-72. PubMed PMID: 28900074. Epub 2017/09/14. rus.

200. Mens MMJ, Ghanbari M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem cell reviews*. 2018 Jun;14(3):309-22. PubMed PMID: 29541978. Pubmed Central PMCID: PMC5960494. Epub 2018/03/16. eng.
201. Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J*. 2002 Aug 1;365(Pt 3):817-24. PubMed PMID: 12133005. Pubmed Central PMCID: PMC1222739. Epub 2002/07/23. eng.
202. Hesketh JE, Pryme IF. Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. *Biochem J*. 1991 Jul 1;277 (Pt 1):1-10. PubMed PMID: 1854327. Pubmed Central PMCID: PMC1151183. Epub 1991/07/01. eng.
203. Yu Z, Fan D, Gui B, Shi L, Xuan C, Shan L, et al. Neurodegeneration-associated TDP-43 interacts with fragile X mental retardation protein (FMRP)/Staufen (STAU1) and regulates SIRT1 expression in neuronal cells. *J Biol Chem*. 2012 Jun 29;287(27):22560-72. PubMed PMID: 22584570. Pubmed Central PMCID: PMC3391095. Epub 2012/05/16. eng.
204. Lebeau G, DesGroseillers L, Sossin W, Lacaille JC. mRNA binding protein staufen 1-dependent regulation of pyramidal cell spine morphology via NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *Molecular brain*. 2011;4:22. PubMed PMID: 21635779. Pubmed Central PMCID: PMC3118231. Epub 2011/06/04. eng.
205. Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Coller JM, et al. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron*. 2006 Dec 21;52(6):997-1009. PubMed PMID: 17178403. Pubmed Central PMCID: PMC1955741. Epub 2006/12/21. eng.
206. Dixit U, Pandey AK, Mishra P, Sengupta A, Pandey VN. Staufen1 promotes HCV replication by inhibiting protein kinase R and transporting viral RNA to the site of translation and replication in the cells. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):5271-87. PubMed PMID: 27106056. Pubmed Central PMCID: PMC4914112. Epub 2016/04/24. eng.
207. Ricci EP, Kucukural A, Cenik C, Mercier BC, Singh G, Heyer EE, et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Jan;21(1):26-35. PubMed PMID: 24336223. Pubmed Central PMCID: PMC4605437. Epub 2013/12/18. eng.
208. Sugimoto Y, Vigilante A, Darbo E, Zirra A, Militti C, D'Ambrogio A, et al. hiCLIP reveals the in vivo atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature*. 2015 Mar 26;519(7544):491-4. PubMed PMID: 25799984. Pubmed Central PMCID: PMC4376666. Epub 2015/03/25. eng.
209. Elbarbary RA, Li W, Tian B, Maquat LE. STAU1 binding 3' UTR IRAlus complements nuclear retention to protect cells from PKR-mediated translational shutdown. *Genes Dev*. 2013 Jul 1;27(13):1495-510. PubMed PMID: 23824540. Pubmed Central PMCID: PMC3713430. Epub 2013/07/05. eng.
210. Jun-Hao ET, Gupta RR, Shyh-Chang N. Lin28 and let-7 in the Metabolic Physiology of Aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Mar;27(3):132-41. PubMed PMID: 26811207. Epub 2016/01/27. eng.
211. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*. 2013 Jan 10;493(7431):231-5. PubMed PMID: 23201690. Pubmed Central PMCID: PMC3674581. Epub 2012/12/04. eng.
212. Milev MP, Ravichandran M, Khan MF, Schriemer DC, Mouland AJ. Characterization of staufen1 ribonucleoproteins by mass spectrometry and biochemical analyses reveal the

presence of diverse host proteins associated with human immunodeficiency virus type 1. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:367. PubMed PMID: 23125841. Pubmed Central PMCID: PMC3486646. Epub 2012/11/06. eng.

213. Abrahamyan LG, Chatel-Chaix L, Ajamian L, Milev MP, Monette A, Clement JF, et al. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci*. 2010 Feb 1;123(Pt 3):369-83. PubMed PMID: 20053637. Epub 2010/01/08. eng.

214. Martel C, Dugre-Brisson S, Boulay K, Breton B, Lapointe G, Armando S, et al. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA*. 2010 Mar;16(3):585-97. PubMed PMID: 20075165. Pubmed Central PMCID: PMC2822923. Epub 2010/01/16. eng.

215. Kim JY, Deglincerti A, Jaffrey SR. A Staufen1-mediated decay pathway influences the local transcriptome in axons. *Translation (Austin, Tex)*. 2017;5(2):e1414016. PubMed PMID: 29416957. Pubmed Central PMCID: PMC5798196. Epub 2018/02/09. eng.

216. Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, et al. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol*. 2008 May;28(9):2896-907. PubMed PMID: 18316402. Pubmed Central PMCID: PMC2293094. Epub 2008/03/05. eng.

217. Bonnet-Magnaval F, Philippe C, Van Den Berghe L, Prats H, Touriol C, Lacazette E. Hypoxia and ER stress promote Staufen1 expression through an alternative translation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 10/14;479(2):365-71.

218. Kretz M. TINCR, staufen1, and cellular differentiation. *RNA biology*. 2013 Oct;10(10):1597-601. PubMed PMID: 24019000. Pubmed Central PMCID: PMC3866239. Epub 2013/09/11. eng.

219. Watson G, Ronai ZA, Lau E. ATF2, a paradigm of the multifaceted regulation of transcription factors in biology and disease. *Pharmacol Res*. 2017 May;119:347-57. PubMed PMID: 28212892. Pubmed Central PMCID: PMC5457671. Epub 2017/02/19. eng.

220. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*. 1987 Dec 4;238(4832):1386-92. PubMed PMID: 2825349. Epub 1987/12/04. eng.

221. Peng W, Zhang Y, Zhu R, Mechref Y. Comparative membrane proteomics analyses of breast cancer cell lines to understand the molecular mechanism of breast cancer brain metastasis. *Electrophoresis*. 2017 Sep;38(17):2124-34. PubMed PMID: 28523741. Epub 2017/05/20. eng.

222. Yang CC, Chen YT, Chang YF, Liu H, Kuo YP, Shih CT, et al. ADAR1-mediated 3' UTR editing and expression control of antiapoptosis genes fine-tunes cellular apoptosis response. *Cell death & disease*. 2017 May 25;8(5):e2833. PubMed PMID: 28542129. Pubmed Central PMCID: PMC5520689. Epub 2017/05/26. eng.

223. Damas ND, Marcatti M, Come C, Christensen LL, Nielsen MM, Baumgartner R, et al. SNHG5 promotes colorectal cancer cell survival by counteracting STAU1-mediated mRNA destabilization. *Nature communications*. 2016 Dec 22;7:13875. PubMed PMID: 28004750. Pubmed Central PMCID: PMC5192221. Epub 2016/12/23. eng.

224. Liu Z, Chen Z, Fan R, Jiang B, Chen X, Chen Q, et al. Over-expressed long noncoding RNA HOXA11-AS promotes cell cycle progression and metastasis in gastric cancer. *Molecular cancer*. 2017 Apr 26;16(1):82. PubMed PMID: 28441948. Pubmed Central PMCID: PMC5405470. Epub 2017/04/27. eng.

225. Xu TP, Liu XX, Xia R, Yin L, Kong R, Chen WM, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene*. 2015 Nov 5;34(45):5648-61. PubMed PMID: 25728677. Epub 2015/03/03. eng.
226. Crawford Parks TE, Marcellus KA, Langill J, Ravel-Chapuis A, Michaud J, Cowan KN, et al. Novel Roles for Staufen1 in Embryonal and Alveolar Rhabdomyosarcoma via c-myc-dependent and -independent events. *Scientific reports*. 2017 Feb 17;7:42342. PubMed PMID: 28211476. Pubmed Central PMCID: PMC5314364. Epub 2017/02/18. eng.
227. Sakurai M, Shiromoto Y, Ota H, Song C, Kossenkov AV, Wickramasinghe J, et al. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Jun;24(6):534-43. PubMed PMID: 28436945. Pubmed Central PMCID: PMC5461201. Epub 2017/04/25. eng.
228. Xu TP, Wang YF, Xiong WL, Ma P, Wang WY, Chen WM, et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell death & disease*. 2017 Jun 1;8(6):e2837. PubMed PMID: 28569791. Pubmed Central PMCID: PMC5520882. Epub 2017/06/02. eng.
229. Boulay K. Identification de modifications post-traductionnelles de Staufen1 et étude de leur fonction régulatrice. Thèses et mémoires électroniques de l'Université de Montréal Université de Montréal 2013.
230. Heim A, Rymarczyk B, Mayer TU. Regulation of Cell Division. *Adv Exp Med Biol*. 2017;953:83-116. PubMed PMID: 27975271. Epub 2016/12/16. eng.
231. Lovci MT, Bengtson MH, Massirer KB. Post-Translational Modifications and RNA-Binding Proteins. *Adv Exp Med Biol*. 2016;907:297-317. PubMed PMID: 27256391. Epub 2016/06/04. eng.
232. Castello A, Fischer B, Frese CK, Horos R, Alleaume AM, Foehr S, et al. Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol Cell*. 2016 Aug 18;63(4):696-710. PubMed PMID: 27453046. Pubmed Central PMCID: PMC5003815. Epub 2016/07/28. eng.
233. Raposo AE, Piller SC. Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle. *Cell division*. 2018;13:3. PubMed PMID: 29568320. Pubmed Central PMCID: PMC5859524. Epub 2018/03/24. eng.
234. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009 Aug 14;325(5942):834-40. PubMed PMID: 19608861. Epub 2009/07/18. eng.
235. Liao A, Anne. Characterization of arginine methylation of the RNA-binding protein Staufen in neurons. University of Hong Kong: University of Hong Kong; 2015.
236. Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):325-30. PubMed PMID: 30089904. Epub 2018/08/10. eng.
237. Emerman AB, Jambhekar A, Blower MD. Identification and Characterization of Mitotic Spindle-Localized Transcripts. *Methods Mol Biol*. 2016;1413:303-24. PubMed PMID: 27193857. Epub 2016/05/20. eng.
238. Hussain S, Benavente SB, Nascimento E, Dragoni I, Kurowski A, Gillich A, et al. The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *J Cell Biol*. 2009 Jul 13;186(1):27-40. PubMed PMID: 19596847. Pubmed Central PMCID: PMC2712989. Epub 2009/07/15. eng.

239. Zhu YM, Lin J, Chen J, Huang Q, Shao LN, Lai MD. [The expression of Staufen gene in colorectal cancer]. *Yi chuan = Hereditas*. 2005 Sep;27(5):705-9. PubMed PMID: 16257895. Epub 2005/11/01. chi.
240. de Lucas S, Peredo J, Marion RM, Sanchez C, Ortin J. Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication. *J Virol*. 2010 Aug;84(15):7603-12. PubMed PMID: 20504931. Pubmed Central PMCID: PMC2897607. Epub 2010/05/28. eng.
241. Chatel-Chaix L, Abrahamyan L, Frechina C, Mouland AJ, DesGroseillers L. The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol*. 2007 Jun;81(12):6216-30. PubMed PMID: 17428849. Pubmed Central PMCID: PMC1900086. Epub 2007/04/13. eng.
242. Ghoujal B, Milev MP, Ajamian L, Abel K, Mouland AJ. ESCRT-II's involvement in HIV-1 genomic RNA trafficking and assembly. *Biol Cell*. 2012 Sep 14. PubMed PMID: 22978549. Epub 2012/09/18. Eng.
243. Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, Desgroseillers L. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology*. 2008;5:41. PubMed PMID: 18498651. Pubmed Central PMCID: PMC2409373. Epub 2008/05/24. eng.
244. Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trepanier V, Mollet S, Frechina C, et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul;42(12):7867-83. PubMed PMID: 24906885. Pubmed Central PMCID: PMC4081104. Epub 2014/06/08. eng.
245. Oncomine [Internet]. Thermo Fisher. 2018. Available from: www.oncomine.org/.