

Université de Montréal

**Implication de la protéine Staufen 2 dans les voies de réponse aux dommages à  
l'ADN**

*Par*

CONDÉ Lionel

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science (M.Sc.)

en biochimie option génétique moléculaire

Octobre, 2019

© CONDÉ Lionel, 2019



Université de Montréal

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Implication de la protéine Staufen 2 dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN**

*Présenté par*

**Lionel Condé**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Luis Rokeach**

Président-rapporteur

**Luc DesGroseillers**

Directeur de recherche

**Francis Rodier**

Membre du jury





## Résumé

De nombreuses voies de signalisation cellulaire complexes permettent de répondre à la présence de dommages à l'ADN. Cette réponse cellulaire est indispensable afin d'éviter l'accumulation de mutations pouvant éventuellement conduire à la transformation tumorale. Ces différentes voies de réponse aux dommages à l'ADN sont hautement coordonnées et sont regroupées au sein d'un mécanisme global appelé DNA damage response (DDR). Les facteurs du DDR sont régulés à plusieurs niveaux de la cascade de l'expression des gènes. De façon notable, plusieurs protéines de liaison à l'ARN (RBP) participent à la régulation de l'expression des gènes du DDR via la régulation post-transcriptionnelle de leur ARN messager. La RBP STAU2 est connue pour lier plusieurs ARNm codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que dans les voies du DDR. La protéine STAU2 est elle-même régulée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription E2F1. De récentes observations laissent penser que la kinase centrale du DDR, CHK1, pourrait être impliquée dans la régulation de la stabilité de STAU2. Par ailleurs, les conséquences cellulaires de la diminution du niveau d'expression de STAU2 sont à ce jour très peu connues.

Ce mémoire a d'abord été entrepris dans le but de mieux comprendre l'implication de la voie de la kinase CHK1 dans la régulation de la protéine de liaison à l'ARN STAU2. CHK1 est une protéine centrale des voies du DDR ainsi que du contrôle de la progression du cycle cellulaire en l'absence de dommages à l'ADN. Nos résultats montrent que la diminution de CHK1 induit une dégradation rapide de STAU2 par les caspases d'une façon indépendante de l'apoptose. Nous avons également renforcé ce lien entre STAU2 et les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN en identifiant plusieurs protéines des voies de réparation dans l'environnement immédiat de STAU2.

D'autre part nos travaux visent à mettre en évidence les conséquences de la déplétion de STAU2 dans plusieurs types cellulaires. STAU2 étant une RBP, sa dérégulation impacte inévitablement le devenir de plusieurs ARNm. Afin de caractériser ces différentes conséquences, nous avons dans un premier temps réalisé la déplétion totale de STAU2

dans des cellules hTert-RPE par la technique de CRISPR/Cas9. Nos résultats montrent que ces cellules accumulent anormalement des dommages à l'ADN et prolifèrent plus rapidement que des cellules normales. En outre plusieurs gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN se retrouvent diminués dans ces cellules. Dans un second temps, afin de définir si cet effet est dépendant du type cellulaire, nous avons induit la diminution de l'expression de STAU2 dans des cellules IMR90. Nous avons montré que dans ce cas, la diminution de STAU2 induit un arrêt du cycle cellulaire et une entrée des cellules en sénescence.

Ainsi, les données présentées dans ce mémoire contribuent à mieux comprendre l'implication de STAU2 dans les processus cellulaires majeurs que sont la régulation du DDR et le contrôle du cycle cellulaire.

**Mots-clés** : STAU2, protéine de liaison à l'ARN, ARN messenger, régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique, réponse aux dommages à l'ADN, cycle cellulaire, sénescence cellulaire, stabilité des protéines, instabilité génomique.

## Abstract

Many complex cellular pathways are induced in response to DNA damages. This cellular response is indispensable to prevent the accumulation of mutations and to avoid malignant transformation. These different pathways are highly coordinated and are organized in a global mechanism called DNA damage response (DDR). Proteins involved in the DDR are regulated at different levels of the gene expression process. Notably, several RNA binding proteins are involved in the regulation of DDR gene expression through the post-transcriptional control of their mRNA. The RBP STAU2 is known to bind various mRNAs coding for proteins involved in the DDR or cell cycle control. STAU2 is regulated at the transcriptional levels by the major transcription factor E2F1. Recent observations suggest that CHK1 could be implicated in the control of the steady-state level of STAU2. Otherwise, the cellular consequences of STAU2 downregulation remain elusive.

The purpose of this research was first to elucidate the implication of CHK1 pathway in STAU2 regulation. CHK1 is a major protein involved in the DDR regulation as well as in the control of cell cycle progression in the absence of DNA damage. Our data show that the downregulation of CHK1 rapidly leads to a caspase-dependent degradation of STAU2 independently of apoptosis. The link between STAU2 and mechanisms of DNA repair was reinforced by our BioID2 experiment that identified several proteins of the DDR in close proximity with STAU2.

On the other hand, the aim of this study was to determine the consequences of STAU2 downregulation in different cell lines. Given that STAU2 is an RBP, its dysregulation will inevitably change the fate of several mRNA. In order to increase our understanding of these consequences, we generated an hTert-RPE1 STAU2-KO cell line using the CRISPR/Cas9 technique. Our data show that these cells accumulate DNA damage and have an increased proliferation rate. Moreover, several genes involved in the DNA repair pathway are downregulated. We also downregulated STAU2 in IMR90 to determine if the

previous observations are cell-type specific. In the latter case, STAU2 diminution triggers cell cycle arrest and cellular senescence.

Altogether, these results contribute to improve our knowledge of STAU2 function, especially in DNA damage response pathway and in cell cycle regulation.

**Keywords** : STAU2, RNA-binding protein, messenger RNA, post-transcriptional regulation of gene expression, DNA damage response, cellular senescence, cell cycle, protein stability, genomic instability.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>15</b>
<b>Liste des sigles et abréviations .....</b>	<b>17</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>23</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre 1 – La réponse aux dommages à l’ADN.....</b>	<b>27</b>
1.1 L’ADN est une macromolécule extrêmement précieuse.....	27
1.2 Les différents types de dommages à l’ADN.....	28
1.2.1 Les modifications de base.....	28
1.2.2 Les bris à l’ADN.....	29
1.3 Les différentes sources de dommages à l’ADN.....	29
1.3.1 Les sources exogènes.....	30
1.3.1.1 Les rayonnements .....	30
1.3.1.2 Les agents chimiques.....	31
1.3.2 Les sources endogènes .....	31
1.3.3 Le stress répliatif .....	32
1.4 La réponse cellulaire aux dommages à l’ADN .....	33
1.4.1 L’organisation spatio-temporelle de la réponse aux dommages à l’ADN.....	33
1.4.2 La cascade de réponse aux dommages à l’ADN.....	34
1.4.2.1 Les kinases, des éléments centraux du DDR.....	36
1.4.2.2 La voie ATR/CHK1 .....	36

1.4.2.3	La voie ATM/CHK2 .....	38
1.4.2.4	La voie de DNA-PK.....	40
1.4.3	Le DDR, un réseau interconnecté.....	41
1.5	Conséquences cellulaires de l'activation du DDR.....	43
1.5.1	Le contrôle du cycle cellulaire .....	43
1.5.1.1	Les phases du cycle cellulaire .....	43
1.5.1.2	La régulation du cycle cellulaire : les complexes cycline-CDKs .....	44
1.5.1.3	Le contrôle du cycle cellulaire dans un contexte de dommages à l'ADN ...	47
1.5.2	L'activation des voies de réparation.....	49
1.5.3	Le contrôle de la réplication .....	50
1.5.4	Le contrôle du métabolisme cellulaire.....	52
1.5.5	Le contrôle de la transcription et du métabolisme des ARN.....	54
1.5.6	La communication extracellulaire.....	55
1.6	La réparation des dommages à l'ADN .....	56
1.6.1	La réparation des altérations de base et des bris simple brin.....	57
1.6.2	La réparation des bris double brin.....	59
1.7	L'inactivation des voies de réponse aux dommages à l'ADN .....	60
1.8	Échec des mécanismes de réparation et devenir cellulaire .....	61
1.8.1	L'apoptose : la voie de mort cellulaire programmée .....	61
1.8.1.1	La voie intrinsèque.....	62
1.8.1.2	La voie extrinsèque.....	63
1.8.1.3	Les caspases, des éléments centraux de l'apoptose .....	64
1.8.1.4	Les caspases hors de l'apoptose.....	65
1.8.2	La sénescence cellulaire.....	65
1.8.2.1	La sénescence un processus complexe intrinsèquement relié au DDR .....	65
1.8.2.2	Les caractéristiques des cellules sénescents.....	66

1.8.2.3	La signalisation de la sénescence .....	67
1.8.3	Les autres voies de mort cellulaire liées au DDR .....	68
1.9	DDR et maladies.....	69
1.9.1	Le dysfonctionnement du DDR est à l'origine de plusieurs pathologies.....	69
1.9.2	Le DDR comme cible thérapeutique .....	71
	<b>Chapitre 2 – Les protéines de liaison à l'ARN .....</b>	<b>73</b>
2.1	La structure des RBP et leur interaction avec les ARN.....	73
2.2	Les fonctions primaires des RBP .....	75
2.3	L'importance cellulaire des RBP .....	76
2.3.1	Les RBP, des protéines omniprésentes .....	76
2.3.2	Rôle des RBP dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN .....	76
2.3.3	Rôle des RBP dans le contrôle de la prolifération cellulaire.....	78
2.4	RBP et pathologies cellulaires.....	78
	<b>Chapitre 3 – Staufen, une famille de protéines multifonctionnelles.....</b>	<b>81</b>
3.1	Les protéines de la famille Staufen .....	81
3.2	La protéine Staufen 2 .....	82
3.2.1	Caractéristiques générales de Staufen 2 .....	82
3.2.2	Fonctions moléculaires et importance physiologique de Staufen 2.....	85
3.2.3	Implication de STAU2 dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN.....	86
	<b>Hypothèse de travail .....</b>	<b>89</b>
	<b>Manuscrit .....</b>	<b>91</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>91</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>94</b>
	<b>RESULTS.....</b>	<b>102</b>
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>108</b>
	<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>114</b>

<b>REFERENCES</b> .....	<b>115</b>
<b>FIGURE LEGENDS</b> .....	<b>120</b>
<b>FIGURES</b> .....	<b>126</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>139</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>159</b>
<b>Schéma récapitulatif</b> .....	<b>161</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>163</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>191</b>



## Liste des tableaux

Tableau 1. –	Oligonucleotide sequences .....	137
--------------	---------------------------------	-----



# Liste des figures

Figure 1. –	Organisation générale des voies de réponse aux dommages à l'ADN .....	35
Figure 2. –	Cascade de réponse locale aux bris simple brin et aux bris double brin.....	42
Figure 3. –	La signalisation du cycle cellulaire et de ses points de contrôle.....	46
Figure 4. –	Principales voies de réparation des dommages à l'ADN .....	56
Figure 5. –	Régulations du déclenchement de l'apoptose .....	62
Figure 6. –	Les Protéines de liaison à l'ARN ont de multiples fonctions .....	74
Figure 7. –	Représentation schématique des différentes isoformes de Staufen2.....	83
Figure 8. –	Aperçu des voies de régulation de l'expression de Staufen 2 .....	88
Figure 9. –	Decrease of STAU2 protein levels in response to CHK1 pathway inhibition .....	126
Figure 10. –	STAU2 decrease observed in response to CHK1 inhibition involves caspase(s).....	127
Figure 11. –	STAU2 depletion triggers DNA-damage and downregulates several DDR proteins.....	128
Figure 12. –	STAU2 depletion promotes cell proliferation in hTert-RPE1 cells.....	129
Figure 13. –	STAU2 downregulation induces senescence in the untransformed IMR90 cells.....	130
Figure 14. –	Identification of DDR proteins among STAU2 interactome .....	131
Figure S1. –	Prolonged inhibition of CHK1 induces a similar downregulation of STAU2.....	132
Figure S2. –	Downregulation of CHK1 by siRNA induces a decrease of STAU2 protein levels.....	133
Figure S3. –	STAU2 is cleaved in a caspase-dependent manner .....	134
Figure S4. –	Knockout of STAU2 in the un-transformed hTert-RPE1 cell line by CRISPR/Cas9.....	135
Figure S5. –	STAU2 downregulation induces senescence in IMR90 cells with a second shRNA.....	136
Figure 15. –	Implication de STAU2 dans le DDR et dans le contrôle du cycle cellulaire .....	161



## Liste des sigles et abréviations (anglais)

Alt-NHEJ : Alternative nonhomologous end-joining	DDR : DNA damage response
APC : Anaphase-promoting complex	DISC : Death-inducing signaling complex
APE1 : AP endonuclease 1	DNA: Deoxyribonucleic acid
ATM : Ataxia telangiectasia mutated	DNA SCARS : DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence
ATP : Adenosine triphosphate	DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	dNTP : Deoxynucleotide triphosphates
ATRIP: ATR-interacting protein	dsRBD : Double-stranded RNA-binding domain
BAK : Bcl-2 homologous antagonist killer	EXO1 : Exonucléase 1
BAX : Bcl-2-associated X protein	FADD : FAS-associated death domain protein
BER : Base excision repair	FANCM : Fanconi anemia group M protein
BID : BH3 interacting-domain death agonist	FAS : Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
BLM : Bloom syndrome protein	FASL : FAS ligand
CDKs : Cyclin-dependent kinases	GADD : Growth arrest DNA damage protein
CHK1 : Checkpoint kinase 1	
CHK2 : Checkpoint kinase 2	
CKI : Cyclin-dependent kinase inhibitor	

$\gamma$ H2AX : Phosphorylated form of Histone H2A

H2AX : Histone H2A

HMGA2 : High-mobility group AT-hook 2

KH : K homology domain

KRAS : GTPase KRas

KU70 : X-ray repair cross-complementing protein 6

KU80 : X-ray repair cross-complementing protein 5

lncRNA : Long non-coding RNAs

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint protein 1

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

miRNA : micro RNA

MMR : Mismatch repair

mRNA: Messenger RNA

MYC : Myc proto-oncogene protein

NER : Nucleotide excision repair

NES : Nuclear export signal

NHEJ : Non-homologous end joining

NLS : Nuclear localization signal

NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate -induced protein 1 (PMAIP1)

NUMB : Protein numb homolog

p21 : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

p53 : Tumor protein p53

PABP : Poly (A) binding protein

PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase

PARP1 : Poly (ADP-ribose) polymerase 1

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PIKKs : Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases

PNK : Polynucleotide phosphatase

PP2A : Protein phosphatase 2

PPM1D : Protein phosphatase 1D

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

QKI : Protein quaking

RB : Retinoblastoma-associated protein

RBD : RNA-binding domain

RNA: Ribonucleic acid

RNR : Ribonucleotide reductase

ROS : Reactive oxygen species

RPA : Replication protein A

RRM : RNA-recognition motif

SAHF : Senescence-associated heterochromatin foci

SASP : Senescence Associated Secretory Phenotype

SCF : F-box containing complex

SLBP : Histone RNA hairpin-binding protein

SMC : Structural Maintenance of chromosomes protein

SSA : Single-strand annealing

SSBR : Single-Stranded Break Repair

SSM : Staufen swapping motif

STAU1 : Staufen homologue 1

STAU2 : Staufen homologue 2

TAP : Nuclear RNA export factor 1 (NXF1)

TBD : Tubulin binding domain

TFIIH : Transcription factor II H

TNF : Tumor necrosis factor

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand)

UV : Ultra-violet

UV-A : Ultra-violet type A

UV-B : Ultra-violet type B

WRN : Werner syndrome ATP-dependent helicase

XPG : Xeroderma pigmentosum group G-complementing protein

XRCC1 : DNA repair protein XRCC1

ZFR : Zinc finger RNA-binding protein

## Liste des sigles et abréviations (français)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique  
messenger



***Je dédie ce mémoire à tous ceux et à toutes celles qui  
comme moi croient que les connaissances scientifiques  
sont le fondement d'un monde plus humain, plus social et  
surtout plus juste.***

*« Le progrès, ce n'est pas l'acquisition de biens. C'est l'élévation de  
l'individu, son émancipation, sa compréhension du monde. Et pour  
ça il faut du temps pour lire, s'instruire, se consacrer aux autres »*

*Christiane Taubira*

*« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de  
notre imagination et que les illusions de notre ignorance »*

*Claude Bernard*

*« La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine  
de l'humanité »*

*Louis Pasteur*



# Remerciements

Le temps que j'ai passé au département de Biochimie et Médecine Moléculaire, et plus particulièrement dans le laboratoire du Dr. Luc DesGroseillers, a été extrêmement enrichissant. Au cours de ces années, j'ai eu la chance de m'épanouir sur le plan scientifique et intellectuel dans un environnement agréable et propice à l'apprentissage. Si toutes ces journées entre les murs de briques jaunes du département sont passées si vite, c'est sans aucun doute grâce aux personnes que j'y ai côtoyées au quotidien.

Pour ne pas déroger à la coutume, je vais commencer par remercier mon directeur de recherche le Dr. Luc DesGroseillers. L'accueil au sein de son laboratoire pour compléter mon stage puis ma maîtrise est assurément un des événements qui a marqué mon parcours universitaire de ces dernières années. Luc est un scientifique passionné, excellent aussi bien en recherche qu'en enseignement. Évidemment il ne manque pas une occasion de partager son savoir et son expertise en se rendant très disponible. Lors de ces années dans son laboratoire il m'a toujours proposé un projet stimulant et apporté d'innombrables conseils et encouragements pour le mener à bien. J'en suis tout particulièrement reconnaissant. Je le remercie également pour l'autonomie qu'il m'a toujours laissée au laboratoire et pour avoir maintenu en permanence un environnement dans lequel il était facile de faire de la recherche. Au cours de nos nombreuses discussions, j'ai bien sûr appris à apprécier la recherche et particulièrement la recherche fondamentale; mais bien au-delà de cela, il m'a appris à aimer la science. La science qui est animée par la curiosité de la découverte, l'attrait du savoir, mais surtout la soif de la compréhension du monde qui nous entoure. Je suis persuadé que vous m'avez appris à être un bon scientifique avec un solide esprit critique; je tâcherai de m'en souvenir longtemps. Et bien sûr, puisque c'est ce dont il est question ici, merci pour la relecture de ce mémoire.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont souvent conseillé, parfois écouté, et surtout toujours supporté. Je sais que la tâche n'est pas aisée (c'est bien la seule fois où je vais le reconnaître). Quoi qu'il en soit, vous êtes maintenant de vrais amis. Merci, Xin, Yulemi, Rémy, Bellastrid, Alicia, Florence, Sami, Mehdi et les autres. Je remercie également tous les anciens étudiant.e.s qui nous ont permis d'acquérir tant de connaissances sur les protéines de la famille Staufén. J'encourage également tous ceux et celles qui compléteront ces connaissances dans le futur.

Xin, merci pour toutes les choses que tu m'as apprises à mon arrivée au laboratoire. Tu as si gentiment partagé ton expérience et ton projet avec moi. Je te remercie de m'avoir transmis la rigueur scientifique et l'efficacité dans les manipulations; soit sûre que ça m'a servi au quotidien et j'espère que ça me servira encore longtemps. Je n'oublie pas non plus tous ces lunchs où tu m'as fait goûter tant de mets. Tes recettes ont très souvent des airs de protocole, mais le résultat est toujours garanti.

Yulemi, parfois peu de mots sont préférables aux longs discours. Cela serait bien trop long d'énumérer ici tout ce qu'on a en commun, d'ailleurs on parle bien assez souvent pour que tu saches ce que je pense de toi. Je vais donc me contenter de dire merci pour tout. J'ajouterai que je te souhaite tout le meilleur pour la fin de ton doctorat. Merci aussi pour toutes les fois où tu m'as rappelé que c'était important de manger ou de dormir.

Bellastrid, garde ton énergie et ta rigueur. Je suis persuadé que tu vas apprécier ta maîtrise chez Luc autant que moi. N'oublie pas que je serai toujours disponible pour te donner un coup de main.

Alicia, tu aimes souvent me rappeler que tu es ma meilleure stagiaire puisque tu es la seule à ce jour. Laisse-moi te rappeler que ça fait aussi de toi la pire. Je sais que tu sauras apprécier mon humour français. Ceci étant dit, je veux te remercier pour tout ce que tu as apporté au projet. Merci également, pour toutes les questions que tu m'as posées, pour toutes les fois où tu m'as challengé et où tu m'as fait remettre en cause mes certitudes. Sans le savoir, tu m'as énormément appris, certainement bien plus que ce que j'ai pu te transmettre. Je suis persuadé que tu t'épanouiras dans ta future maîtrise autant que moi dans celle-ci. N'oublie pas que rien n'est impossible quand on est motivé, et dans ce domaine je ne m'inquiète pas du tout pour toi. Merci aussi pour tout ce que tu as partagé avec moi sur le Québec et notamment le vocabulaire, même après 5 ans j'avais encore des choses à apprendre.

Pour continuer sur cette lancée, je remercie tous les Québécois et Québécoises qui m'ont si gentiment accueilli ici chez eux. J'ai découvert une culture incroyable qui m'a enrichi au quotidien et que je continue d'apprécier.

Je n'oublie pas non plus les membres du laboratoire Ferbeyre avec qui ça a toujours été un plaisir d'échanger, de rigoler et de travailler. Vous êtes bien trop nombreux pour que je vous nomme tous ici, mais vous savez que je vous apprécie tous et toutes. Je voudrais prendre le temps de remercier Fred pour ses innombrables conseils. Tu m'as beaucoup fait réfléchir sur la science et

plus particulièrement sur mon projet. C'est sans doute le temps que tu accordes aux autres qui est ton meilleur trait de caractère. Je suis sûr que tu resteras un excellent chercheur et que tu auras la chance d'avoir ton propre labo dans peu de temps. Si je devais retenir une seule chose de tout ce que tu m'as appris, c'est certainement que les protéines ribosomales ne sont pas des contaminants. Je prends également quelques instants pour remercier Jacob pour avoir animé mes soirées de travail au laboratoire avec ses inventions toutes plus folles les unes que les autres. Ne lâche jamais tes objectifs, je suis personnellement convaincu que s'investir dans les choses à fond finit toujours par payer. Merci également à Véronique pour tous ses bons conseils et pour sa contribution au projet.

Merci aussi à tout le personnel du Département de Biochimie qui nous donne le sourire au quotidien, je pense, entre autres à vous, Robert et Ginette, votre bonne humeur fait vraiment la différence. Merci également à Monique et Nicolas pour leur soutien en microscopie; Louise pour son aide en culture cellulaire et Éline pour tout le côté administratif.

Les gens qui me connaissent bien savent à quel point j'ai besoin de m'engager dans d'innombrables projets pour trouver un certain équilibre. Tous les projets dans lesquels j'ai été impliqué ces dernières années m'ont sans aucun doute aidé à passer au travers de cette maîtrise avec joie et facilité. Je remercie d'ailleurs Luc pour m'avoir toujours laissé le temps d'y prendre part.

Pour commencer, je voudrais remercier le laboratoire d'enseignement pour m'avoir permis d'y être auxiliaire. J'ai pu apprendre en transmettant des connaissances. Cette expérience a eu une saveur particulière pour moi puisque c'est dans ces mêmes murs que je suis également passé comme étudiant sous-gradué. Pour moi la transmission des connaissances est intrinsèquement liée au métier de scientifique, je pense que c'est même un devoir, alors merci de m'avoir donné cette chance.

Au-delà de cela, je vous remercie pour tous les projets que nous avons menés ensemble. Sho, Seb, Phil, Mimi, votre motivation, votre habileté au travail d'équipe et votre dévouement m'ont beaucoup inspiré. J'espère sincèrement que nos différents projets perdureront dans le temps. J'en profite aussi pour te remercier Audrey puisque tu as presque toujours pris part à ces projets. Merci aussi pour toutes les discussions qu'on a partagées dans le cadre de ta porte. Tes encouragements ont toujours été extrêmement appréciés. En bref, vous êtes tous les cinq incontestablement devenus des amis.

Ensuite, je voudrais remercier mes amis qui continuent à m'écouter quand je commence une phrase par « je crois que j'ai une idée » et qui s'embarquent avec enthousiasme dans ces projets parfois un peu farfelus. Notre dernier projet reseauLAB a sans conteste animé ma dernière année de maîtrise; Merci Sarah, Sean, Marion, Hadjara, Yulemi, Julie, pour votre investissement et vos encouragements. « Petite Julie », on se connaît depuis qu'on est arrivé ici, on s'est suivi jusqu'à maintenant et ça a toujours été incroyable, j'espère que tout ça va continuer et surtout ne change rien. Merci pour toutes ces heures où tu m'a laissé envahir le Département de Pharmacologie. Merci aussi à tous mes autres amis qui sont patients avec moi bien plus que de raison. Je n'oublie pas non plus tous ceux et celles qui ont embarqué avec moi dans l'association de notre programme. Sans vous, je n'aurais sûrement pas pu combiner aussi facilement la présidence et mon projet de recherche.

Je veux garder quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'arriver là où je suis aujourd'hui à quelque 6000 km de mon ancien chez-moi. Je pense particulièrement à tous mes professeurs qui sur les bancs de l'école de la République m'ont transmis leurs connaissances. Je me rappelle particulièrement de ce jour où mon proviseur, Jacques Puel, m'a dit au coin d'un couloir : « Lionel trouve un métier qui te plaît et tu ne travailleras plus une seule journée de ta vie » je pense qu'il avait raison.

Voici arrivés les remerciements les plus importants pour moi, ceux destinés à ma famille. C'est sans aucun doute envers vous que je suis le plus redevable et le plus reconnaissant. Je veux remercier tout particulièrement, mes parents, mes grands-parents, mes frères mon oncle et ma tante. Ils m'ont tous sans cesse encouragé et soutenu dans la poursuite de mes rêves et de mes objectifs même quand ceux-ci impliquaient de partir loin, très loin. Une chance qu'on soit depuis toujours une famille « téléphone ». Ils m'ont également toujours poussé à me dépasser et à construire de nouveaux projets plus hauts les uns que les autres. Merci, Maman, pour toutes les fois où tu m'as aidé lors de mes études. Bien sûr, je ne parle pas uniquement des fois où tu as corrigé mes fautes de français, mais aussi de toutes les fois où tu m'as encouragé à aller plus loin pour faire ce qui me plaît. Je suis particulièrement fier des valeurs que tu m'as transmises, elles enrichissent sans conteste mon quotidien. Ton dévouement m'impressionne et m'incite à te prendre comme modèle les yeux fermés. Merci Papa pour m'avoir montré que le monde est riche de culture et m'avoir appris à toujours travailler avec rigueur et avec enthousiasme. J'ai une chance incommensurable de tous vous avoir

# Introduction

## Chapitre 1 – La réponse aux dommages à l'ADN

### 1.1 L'ADN est une macromolécule extrêmement précieuse

L'ADN (*acide désoxyribonucléique*) est le support de l'information génétique, ce qui en fait une des macromolécules cellulaires les plus précieuses. Le maintien de son intégrité est indispensable; d'une part afin de garantir le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire à travers l'expression de différents gènes; d'autre part, afin de transmettre une information fiable et intègre aux cellules filles. Propager une information génétique complète est une priorité constante des cellules afin de garantir la survie à long terme des organismes (1, 2).

Les cellules sont perpétuellement exposées à des agents susceptibles de causer des dommages à l'ADN (3). Lorsque ces dommages ne sont pas réparés, ils deviennent définitifs, ils peuvent alors se propager aux cellules filles lors de la mitose. De façon encore plus notable, si ces dommages surviennent dans une partie codante de l'ADN et plus particulièrement dans un oncogène ou dans un gène suppresseur de tumeur, ils peuvent affecter la survie cellulaire. Ainsi l'accumulation de dommages à l'ADN est fréquemment à l'origine d'instabilité génomique et de pathologies cellulaires telles que le cancer (4).

Il est primordial que les dommages à l'ADN soient pris en charge afin d'éviter leur propagation aux cellules filles. Les cellules possèdent une panoplie de voies de signalisation permettant d'une part de détecter la présence de dommages à l'ADN et d'autre part d'y répondre de façon coordonnée (5).

L'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN engendre des réponses cellulaires multiples. Dans un premier temps, la progression du cycle cellulaire est ralentie ou arrêtée. Ce délai accordé aux cellules favorise la mise en place des voies de

réparation. Ces voies aident au retour à l'état normal des cellules en remédiant aux dommages. Dans le cas où les réparations sont infructueuses, la propagation des dommages est évitée grâce au déclenchement de l'apoptose ou de la sénescence. Le maintien des voies de réponse aux dommages à l'ADN est primordial pour la survie cellulaire et diminue beaucoup l'instabilité génomique (5).

## **1.2 Les différents types de dommages à l'ADN**

Plusieurs sortes d'altérations de la double hélice d'ADN peuvent survenir. Parmi les dommages couramment rencontrés se trouvent les modifications de bases azotées, les bris simple brin, les bris double brin et les *crosslinks*. Les types de dommages formés ont différents niveaux de gravité et leur prise en charge est adaptée à leur sévérité (3).

### **1.2.1 Les modifications de base**

Les nucléotides sont des molécules centrales de la double hélice d'ADN (6). L'altération des bases azotées qui les composent est une des causes les plus courantes de dommages à l'ADN. Ces dommages ont plusieurs origines (7). Selon leur complexité, les modifications de base peuvent être plus ou moins délétères. La plupart des modifications perturbent la lecture de l'ADN lors de la réplication ou lors de la transcription, ce qui augmente le risque de mésappariement et de mutation (8).

Les quatre bases azotées courantes de l'ADN (adénine, cytosine, guanine, thymine) peuvent être oxydées (9). Un des produits formés dans les cellules est la 8-oxo-guanosine, obtenue par oxydation d'une guanine (10). Les bases azotées sont également fréquemment alkylées. Le plus souvent c'est un groupe méthyl qui est ajouté. C'est ainsi que sont formées entre autres les 3-méthyl-adénines, les 7-méthyl-guanines et les 6-méthyl-guanines (11). De nombreux composés extérieurs peuvent également former des adduits avec l'ADN (12). Dans d'autres cas, les bases azotées sont soumises à des processus d'hydrolyse. Lorsque c'est la liaison avec une amine qui est rompue, on parle de désamination. La désamination des cytosines est particulièrement notable. Cette modification conduit à la conversion directe d'une cytosine en thymine et donc à la formation d'un mésappariement immédiat. Dans d'autres cas, c'est la liaison entre la



base azotée et le sucre qui est hydrolysée. Dans ce cas, un site abasique est formé. On parle de site apurinique lorsque la base hydrolysée est une adénine ou une guanine et de site apyrimidique lorsqu'il s'agit d'une cytosine ou d'une thymine (7, 13). Enfin, il arrive que les bases azotées forment des liaisons covalentes entre elles. Celles-ci peuvent être intra-brin, c'est par exemple le cas des dimères de thymine, ou bien inter-brin, on parle alors de *crosslink* (13, 14).

### **1.2.2 Les bris à l'ADN**

Il est fréquent que la structure de la double hélice d'ADN soit directement altérée. Des bris simple brin ou double brin peuvent survenir (13). Les bris simple brin sont plus couramment rencontrés. Ils représentent une atteinte unilatérale de la double hélice d'ADN. Ces bris résultent de la désintégration d'un désoxyribose du squelette sucre-phosphate. Les extrémités libres de part et d'autre du bris subissent souvent différentes modifications. Elles compliquent en général la prise en charge des dommages (15). Les bris simple brin à l'ADN perturbent les processus cellulaires notamment en bloquant la progression de la fourche de réplication (16). Les bris double brin représentent quant à eux une altération complète de la double hélice d'ADN. Ils sont plus rares que les bris simple brin et ils sont hautement délétères. En effet, les extrémités d'ADN sont totalement libres et peuvent induire des recombinaisons et des translocations entre différents chromosomes (17, 18). Ces événements sont à l'origine d'instabilité génomique. Les bris, qu'ils soient simple ou double brin, doivent absolument être pris en charge afin de favoriser la survie cellulaire.

### **1.3 Les différentes sources de dommages à l'ADN**

Un très grand nombre d'éléments peut induire des altérations de la double hélice d'ADN. Lorsque les inducteurs de dommage sont extérieurs aux cellules, on parle de source exogène. À l'opposé, lorsque les dommages proviennent du métabolisme cellulaire en lui-même, on parle de source endogène.

### **1.3.1 Les sources exogènes**

On retrouve dans l'environnement une multitude d'éléments pouvant causer des dommages à l'ADN. Deux grandes catégories sont prédominantes; il s'agit des rayonnements et des agents chimiques. Ces différents inducteurs de dommages peuvent fonctionner soit de façon directe en altérant eux-mêmes la double hélice d'ADN, soit de façon indirecte en formant des produits secondaires qui à leur tour créent une lésion. Dans les deux cas, les cellules ont à leur disposition différents mécanismes pour diminuer leurs impacts.

#### **1.3.1.1 Les rayonnements**

Nous sommes exposés dans notre vie quotidienne à plusieurs sortes de rayonnements. Ceux-ci proviennent principalement du soleil. À terme, une exposition soutenue peut avoir un impact négatif sur la structure et la composition de l'ADN. Cela mène notamment à l'accumulation de dommages à l'ADN et à l'apparition d'instabilité génomique.

Les rayons UV (*Ultra-violet*) sont une source importante de dommages à l'ADN. Une exposition excessive est responsable d'une augmentation de l'instabilité génomique (19). Les rayons UV peuvent induire des dommages de façon directe ou de façon indirecte (20). Les UV-A (320-400 nm) sont ceux auxquels nous sommes naturellement le plus exposés (21). Ceux-ci causent majoritairement des dommages à l'ADN de façon indirecte (22). Lorsqu'ils pénètrent dans les cellules, ils induisent la formation de radicaux libres en stimulant différentes molécules cellulaires. Ces radicaux libres altèrent à leur tour les bases azotées ou les sucres de la double hélice d'ADN conduisant à une accumulation de bases endommagées ou de bris simple brin (22, 23). Les UV-B (290–320 nm) sont quant à eux le plus souvent directement absorbés par les bases azotées. Il s'en suit la formation de photo-produit tel que les dimères de pyrimidine (20, 24). Ceux-ci peuvent par la suite créer des dommages secondaires lors des processus cellulaires tels que la réplication ou la transcription de l'ADN (25).

Les rayons ionisants sont également une source importante de dommages à l'ADN (26, 27). Ils regroupent entre autres les rayons X et les rayons gamma (3). Dans la vie courante, nous les rencontrons principalement par l'intermédiaire des rayonnements cosmiques,

des isotopes radioactifs ou encore des traitements spécifiques tels que les radiothérapies (3). Les rayons ionisants induisent des dommages à l'ADN soit de façon directe en étant absorbés par l'ADN, soit de façon indirecte par l'intermédiaire de ROS (*Reactive oxygen species*) (28). Les dommages qui en résultent sont des bris simple brin, des bris double brin ou des altérations des bases azotées (29, 30). Il arrive fréquemment que les rayons ionisants produisent divers types de dommages très rapprochés. Ces dommages appelés *clustered* sont particulièrement difficiles à réparer et favorisent l'apparition de dommages persistants (31, 32).

### **1.3.1.2 Les agents chimiques**

Nous sommes au cours de notre vie perpétuellement exposés à des agents chimiques d'origine naturelle ou artificielle. Ces agents chimiques induisent très fréquemment des dommages à l'ADN (12, 33). L'induction de ces dommages par les composés chimiques repose sur différents mécanismes. Une fois incorporés aux cellules, certains agents génotoxiques altèrent directement l'ADN (34). Dans d'autres cas, ces agents ne sont pas directement nocifs; ils deviennent toxiques par l'intermédiaire de réactions avec d'autres métabolites cellulaires (35). Enfin, il arrive également que les agents génotoxiques ne ciblent pas directement la structure de double hélice d'ADN mais plutôt des processus cellulaires reliés. C'est par exemple le cas de la camptothécine qui inhibe la topoisomérase I. La topoisomérase I est nécessaire pour retirer les surenroulements positifs à l'avant de la fourche de réplication. Pour cela, cette enzyme induit temporairement un clivage simple brin de l'ADN. L'association de la camptothécine avec la topoisomérase I perturbe la réparation de la coupure de l'ADN rendant ainsi le bris simple brin permanent (36). Les agents chimiques, quel que soit leur mécanisme d'action sont très souvent impliqués dans l'apparition de dommages à l'ADN et dans la carcinogénèse.

### **1.3.2 Les sources endogènes**

Les dommages à l'ADN peuvent également provenir du métabolisme cellulaire. Dans ce cas, ce sont des composés cellulaires qui induisent des dommages à la double hélice d'ADN. Les ROS sont un médiateur majeur de ce type de dommage. Ce sont des

molécules oxygénées hautement réactives. Les ROS ont différentes origines cellulaires. Ils sont produits par les mitochondries, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique ou encore certaines protéines membranaires telles que la NADPH oxydase (37). Par ailleurs, plusieurs sources exogènes de dommages à l'ADN telles que l'exposition aux rayons ionisants ou à la chimiothérapie peuvent induire la formation de ROS. Ces mécanismes sont dépendants de l'hydrolyse de molécules d'eau (37, 38). Les ROS libres induisent ensuite des dommages à l'ADN en oxydant les bases azotées. Dans certaines conditions particulières comme l'inflammation, le niveau de ROS peut augmenter. Ainsi en présence d'inflammation, les cellules sont plus sujettes au développement de stress génotoxique (39). En outre, il arrive également que des dommages à l'ADN endogènes surviennent par hydrolyse spontanée des bases azotées (38).

### **1.3.3 Le stress répliatif**

La réplication de l'ADN est un des processus primordiaux pour la survie cellulaire. Elle doit être particulièrement régulée puisqu'elle ne doit survenir qu'une seule fois par cycle cellulaire. En fin de phase G<sub>1</sub>, le complexe hélicase MCM est recruté sur différentes origines de réplication réparties sur les chromosomes. Cet ensemble forme ainsi le complexe de pré-initiation de la réplication (40). En début de phase S, CDK2 phosphoryle les complexes MCM ce qui permet le recrutement de la machinerie de réplication incluant les ADN polymérases  $\epsilon$  et  $\delta$  et PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) (41). La synthèse de l'ADN peut alors commencer de façon bidirectionnelle.

Il peut arriver que divers éléments ralentissent ou perturbent la réplication de l'ADN. On parle alors de stress répliatif (42). Le stress répliatif a différentes origines. La réplication est fortement couplée à la progression du cycle cellulaire. L'expression d'oncogènes qui accélèrent le cycle cellulaire induit souvent du stress répliatif (43, 44). Le stress répliatif peut également provenir de collision entre la machinerie de transcription et celle de réplication. En effet en fin de phase G<sub>1</sub> et en début de phase S la transcription est encore active. Ces collisions sont particulièrement graves car elles peuvent mener à la formation d'hybride DNA/RNA (R-loop) (45, 46). Enfin, un stress répliatif peut survenir lorsque la machinerie de réplication rencontre un dommage à l'ADN (47).

Lorsqu'un stress répliatif survient, il est souvent accompagné d'un découplage des polymérasés de répliaton et du complexe hélicase (complexe MCM) (48). Cela induit la formation de longues zones d'ADN simple brin. Ces zones sont protégées par des protéines RPA (*replication protein A*) afin de ne pas être endommagées. Le recrutement des RPA déclenche les voies de réponse aux dommages à l'ADN et l'arrêt au point de contrôle intra-S (49). De plus, il est fréquent que les fourches de répliaton bloquées s'effondrent. Cela favorise l'apparition de bris double brin à l'ADN. En effet, l'ADN a une organisation spécifique au niveau de la fourche de répliaton. Lorsque la fourche rencontre un bris simple brin, elle le convertit en bris double brin (42). Ainsi le stress répliatif peut être causé par la présence de dommages à l'ADN mais il peut également lui-même contribuer à leur apparition renforçant la présence d'instabilité génomique.

#### **1.4 La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN**

Comme nous l'avons vu plus tôt, les cellules subissent au cours de leur existence un grand nombre d'altérations de leur matériel génétique. Afin de maintenir l'intégrité génomique il est primordial pour une cellule d'être en mesure de répondre aux dommages à l'ADN. Cette réponse doit être rapide et efficace afin d'éviter la propagation des dommages aux cellules filles. Le DDR (*DNA damage response*) est un réseau complexe de voies de signalisation cellulaire qui a pour but de répondre au mieux aux dommages à l'ADN en enclenchant une réponse cellulaire adaptée (Figure 1). Ainsi les voies de réponses sont multiples et sont spécifiques au type de dommages (3). Le DDR est composé d'un ensemble de protéines possédant des fonctions très diverses. Parmi elles, on retrouve majoritairement des protéines régulatrices et des protéines avec une activité enzymatique. La réponse aux dommages à l'ADN est hautement régulée dans l'espace et dans le temps. En effet, bien que les altérations de l'ADN soient nucléaires, la réponse cellulaire doit avoir lieu à l'échelle de la cellule (50).

##### **1.4.1 L'organisation spatio-temporelle de la réponse aux dommages à l'ADN**

Pour fonctionner de façon efficace, la réponse aux dommages à l'ADN doit être hautement coordonnée. Bien que les protéines impliquées dans la cascade de réponse

soient dépendantes du type de dommage ou du moment où ceux-ci surviennent, le principe général de fonctionnement est semblable. Dans un premier temps, le site de dommages doit être identifié et modifié afin de déclencher la cascade de réponse. Ce sont des protéines appelées senseurs qui participent à cette étape (5). Une fois que le site de dommages est identifié, la réponse cellulaire se développe parallèlement sur deux plans. D'une part, elle est renforcée localement, notamment en concentrant divers facteurs du DDR à proximité du site de dommages. D'autre part, elle se propage au reste de la cellule via différentes cascades de signalisation cellulaire (5). Ce développement à la fois proximal et distal de la réponse aux dommages à l'ADN est concerté afin de prendre les différentes mesures nécessaires au maintien de l'intégrité génomique. Pour propager la signalisation des dommages, les senseurs activent rapidement des transducteurs, qui à leur tour activent des médiateurs. Ensemble, ces différentes protéines contribuent à amplifier la force du signal. Les médiateurs activent ensuite différents effecteurs (5). Ceux-ci sont responsables de la mise en place de la réponse cellulaire. Cela permet aux cellules de faire face à la présence de dommages à l'ADN. Les effecteurs induisent par exemple l'arrêt du cycle cellulaire ou l'activation de voies de réparation (51). La réponse aux dommages à l'ADN est échelonnée dans le temps et différents niveaux d'activation sont impliqués. Ainsi une réponse différée aux dommages à l'ADN peut succéder à la réponse initiale. Si les dommages ont pu être réparés, la cascade du DDR est ensuite inactivée afin de permettre aux cellules de retourner à un état normal. Dans le cas échéant, les protéines effectrices du DDR peuvent activer des processus limitant les conséquences des dommages tels que la mort cellulaire programmée ou la sénescence (50).

#### **1.4.2 La cascade de réponse aux dommages à l'ADN**

La régulation des protéines impliquées dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN a lieu à de nombreux niveaux. Cette régulation repose en grande partie sur des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations. Les trois kinases centrales du DDR, ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), ATM (*ataxia*

*telangiectasia mutated*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) participent largement à ces mécanismes (3). Une grande partie de la régulation a également lieu au niveau transcriptionnel grâce à l'implication de nombreux facteurs de transcription de premier plan tels que p53, E2F ou encore NF- $\kappa$ B (52).

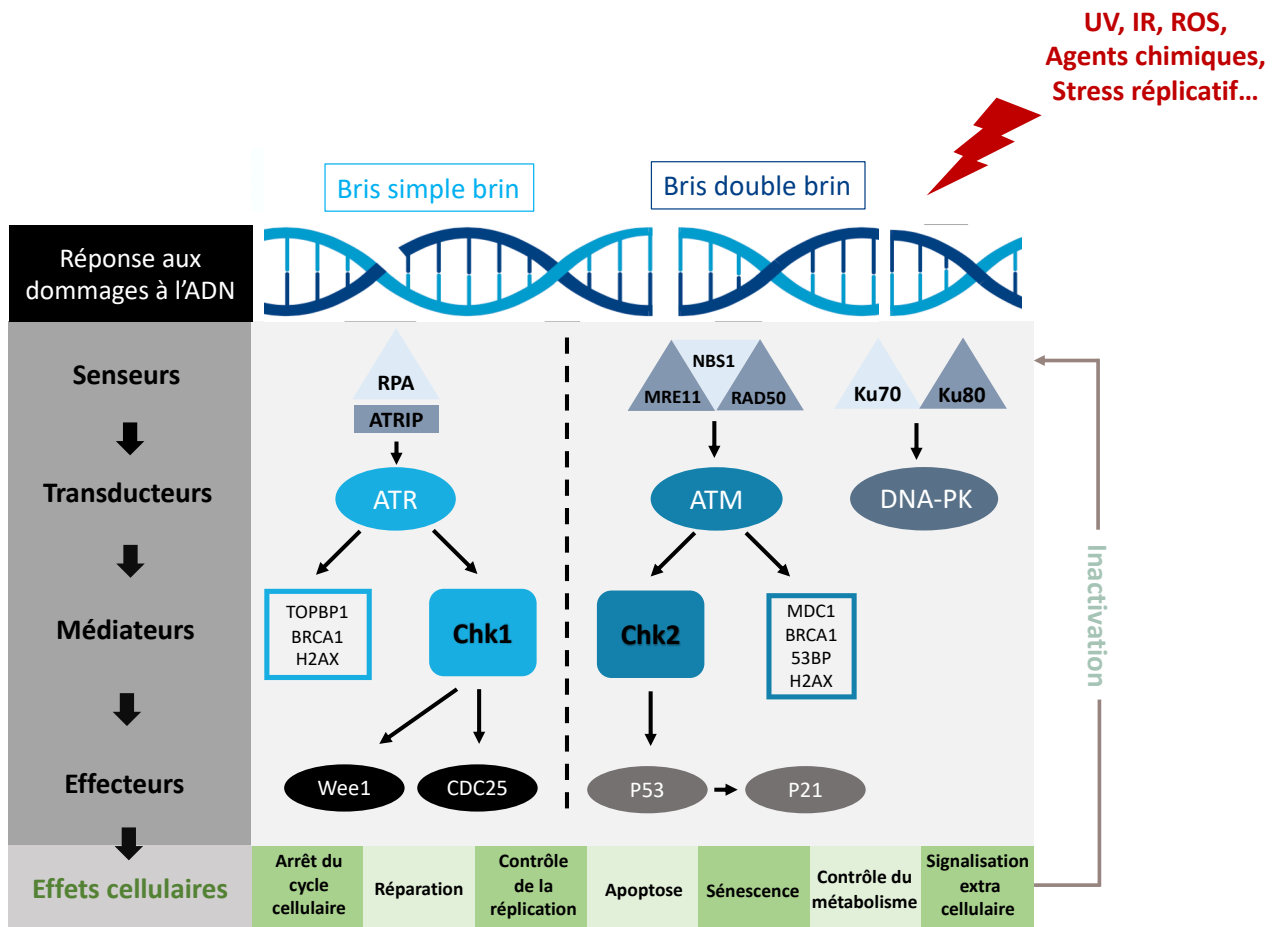


Figure 1.

**Figure 1 : Organisation générale des voies de réponse aux dommages à l'ADN.**

Les voies de réponse aux dommages à l'ADN (DDR: *DNA damage response*) sont organisées en plusieurs niveaux. L'organisation globale du DDR est schématisée ci-dessus. Lorsque des dommages à l'ADN sont détectés par les senseurs (RPA-ATRIP, MRE11-NBS1-RAD50, Ku70-Ku80), des transducteurs (ATR, ATM, DNA-PK) sont recrutés et activés. Une fois activées, ces kinases centrales du DDR activent à leur tour plusieurs médiateurs, dont CHK1 et CHK2. Ces médiateurs induisent enfin l'activation de plusieurs effecteurs qui engendrent plusieurs effets cellulaires. Un rétrocontrôle négatif permet ensuite d'inactiver la cascade du DDR.

#### **1.4.2.1 Les kinases, des éléments centraux du DDR**

Chez les humains, trois voies majeures sont impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. Chacune de ces voies est médiée par l'une des kinases suivantes : ATR, ATM ou DNA-PK. La première voie est principalement impliquée dans la réponse aux dommages simple brin à l'ADN alors que les deux autres sont impliquées dans la réponse aux dommages double brin à l'ADN (3). Ces trois protéines appartiennent à la famille des PI3-kinases (*phosphoinositiden3-kinase*). Les *Phosphatidy-linositol 3-kinase-related kinases* (PIKKs) régulent chez les mammifères divers processus cellulaires incluant la réponse aux dommages à l'ADN (53). Les protéines ATR, ATM et DNA-PK ont toutes les trois une structure très conservée. Comme toutes les PIKKs, elles possèdent un domaine kinase en C-terminal. De part et d'autre de ce domaine kinase sont retrouvés deux domaines spécifiques; un domaine FAT en amont et un domaine FATC en aval. La fonction de ces différents domaines n'est pas complètement définie (54).

#### **1.4.2.2 La voie ATR/CHK1**

Les bris simple brin à l'ADN ainsi que le stress réplicatif surviennent très fréquemment dans la vie d'une cellule. S'ils ne sont pas rapidement résorbés, ils peuvent engendrer des lésions plus sévères. La voie ATR/CHK1 est impliquée dans leur prise en charge. Cette voie joue également un rôle plus général de surveillance du cycle cellulaire.

Lorsqu'un bris simple brin à l'ADN ou un stress réplicatif survient, les protéines RPA s'accumulent rapidement au niveau de l'ADN simple brin (Figure 2) (55). Elles jouent ainsi le rôle de senseur. Cette accumulation est un signal d'alerte pour la cellule qui induit ensuite le recrutement de la protéine ATRIP (*ATR-interacting protein*) aux sites de dommages (49). L'arrivée de ATRIP permet de recruter ATR qui peut ainsi remplir sa fonction de transducteur (56). Le complexe 911 (RAD9, HUS1, RAD1) est parallèlement recruté aux sites de dommage. Le chargement du complexe 911 sur l'ADN est médié par le complexe RAD17-RFC. Ce complexe est préalablement localisé à la jonction entre



l'ADN double brin et l'ADN simple brin (57). Le complexe 911 est particulièrement important pour stabiliser ATR aux sites de dommages. Il facilite également la phosphorylation de ses différents substrats (57, 58). La protéine TOPBP1 est ensuite recrutée aux sites de dommages par une interaction avec la protéine RAD9 du complexe 911 (59). TOPBP1 permet de stimuler l'activité kinase de ATR (60, 61). La présence du complexe 911 et de TOPBP1 est nécessaire afin d'obtenir une activation totale d'ATR (62). L'absence de ces deux coactivateurs est à l'origine d'une augmentation du stress génotoxique et peut sous certaines conditions être létale (63, 64). Il a plus récemment été rapporté que l'activation de ATR est parfois médiée par la protéine ETAA1 (62). Cette protéine est recrutée dans la zone de dommage par une interaction avec les protéines RPA (62). Il a également été montré que cette protéine était nécessaire pour maintenir l'intégrité génomique (65). En l'absence de stress cellulaire, ATR est présente sous forme inactive. Elle est activée par une autophosphorylation sur la thréonine 1989 (66, 67). Cette phosphorylation est une marque courante d'activation d'ATR (67).

ATR active ensuite plusieurs médiateurs tels que les claspins (68). Ces protéines servent d'intermédiaire au recrutement de la protéine CHK1 (*checkpoint kinase 1*) (69, 70). Enfin, ATR phosphoryle CHK1 sur la sérine 317 et la sérine 345 afin de l'activer (69, 71). Cette activation initiale est renforcée par une autophosphorylation de CHK1 sur la sérine 296 (72). Une fois activée, CHK1 s'éloigne du site de dommages et phosphoryle à son tour un grand nombre de substrats afin d'enclencher une réponse cellulaire plus large (73). Parmi ces substrats se retrouvent plusieurs effecteurs des voies de réponse aux dommages à l'ADN ainsi que plusieurs régulateurs du cycle cellulaire (73, 74). Leur phosphorylation par CHK1 conduit à l'activation de différents points de contrôle du cycle cellulaire. CHK1 induit par exemple la phosphorylation des protéines de la famille de CDC25 et de la kinase WEE1. Ces actions induisent une inhibition des complexes cycline-CDKs spécifiques permettant l'arrêt des cellules au point de contrôle G<sub>1</sub>/S, intra-S ou G<sub>2</sub>/M (75-77). Ces différents mécanismes seront vus en détail dans la section dédiée au contrôle du cycle cellulaire. CHK1 phosphoryle également p53 (*Tumor protein p53*)

menant ainsi à la stabilisation de cet effecteur central des voies de réponse aux dommages à l'ADN (78).

Par ailleurs, la kinase CHK1 joue un rôle de surveillance du cycle cellulaire en l'absence de dommages à l'ADN (74). En effet, CHK1 participe constamment à la stabilisation de la phase S et au contrôle de la réplication de l'ADN. Elle évite notamment le départ d'origines de réplication tardives. Ainsi, l'inhibition de CHK1 induit une augmentation des débuts de synthèse d'ADN non contrôlés. Il en résulte de nombreux effondrements de la fourche de réplication (79, 80). CHK1 prévient également l'entrée précoce des cellules en mitose en contrôlant le point de contrôle G<sub>2</sub>/M. Ce mécanisme implique l'inhibition indirecte des complexes cycline-CDKs de phase M via la phosphorylation de CDC25B (81). De plus, il a été rapporté que CHK1 contrôle le point de contrôle intra-M via la régulation de la kinase Aurora B. Ainsi l'inhibition de CHK1 est à l'origine d'une altération de la ségrégation des chromosomes (82). La déplétion totale de ATR ou de CHK1 induit dans les cellules qui se divisent une baisse de prolifération et une augmentation de la mort cellulaire. Il a également été montré que la déplétion de ATR ou de CHK1 est létale dans les modèles murins (82, 83). Ainsi les kinases ATR et CHK1 sont essentielles à la survie cellulaire. D'une part, elles sont nécessaires à la réponse aux dommages à l'ADN de type simple brin et au stress réplicatif, d'autre part elles sont requises pour le contrôle de plusieurs processus cellulaires en l'absence de dommages.

### **1.4.2.3 La voie ATM/CHK2**

Lorsqu'un bris double brin survient, la réponse cellulaire doit être immédiate au vu de la gravité de celui-ci. La kinase ATM s'impose comme le régulateur en chef de la cascade de réponse aux bris double brin à l'ADN.

Le complexe MRN est un des premiers éléments à lier les extrémités d'ADN dans les zones des bris double brin. Il joue ainsi le rôle de senseur (Figure 2) (84). Ce complexe est composé de trois protéines, MRE11, RAD50 et NBS1 (85). La sous-unité NBS1 interagit directement avec la kinase ATM, ce qui permet son recrutement à proximité du site de dommage (86). Une fois au site de dommage, la protéine ATM est activée afin de jouer son rôle de transducteur et d'enclencher une cascade de signalisation cellulaire.

En l'absence de dommage à l'ADN, ATM se trouve sous forme de dimère inactif (87). Pour être active, ATM s'autophosphoryle sur la sérine 1981 (88). Plusieurs études semblent indiquer que cette phosphorylation n'est pas toujours indispensable pour l'activation d'ATM; elle participerait plutôt à son maintien au site de dommage (84, 89). Cette phosphorylation reste néanmoins une marque reconnue de l'activation d'ATM (88). Deux éléments majeurs sont requis pour stimuler l'activation complète d'ATM. Il s'agit d'une part, de son association avec le complexe MRN et d'autre part, de son acétylation sur la lysine 3016 par la protéine TIP60 (84, 90, 91).

Une fois activée, ATM phosphoryle plusieurs substrats, dont les histones H2AX (92-94). Cette phosphorylation sur la sérine 139 de l'histone H2AX est une marque incontournable des zones de bris double brin. Elle va servir de support aux voies de réponse et de réparation aux dommages à l'ADN (94). La modification post-traductionnelle des histones H2AX ne se limite pas uniquement à celles à proximité directe de la cassure de l'ADN. Elle se propage sur une large zone allant jusqu'à deux mégabases autour du site de dommage (95). Cette amplification du signal est dépendante de la protéine médiatrice MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). Lorsque les premières histones H2AX de part et d'autre du site de dommages sont phosphorylées, elles sont reconnues par la protéine MDC1 qui est alors recrutée localement au niveau du bris. MDC1 est ensuite phosphorylée par ATM afin d'être stabilisée (96, 97). MDC1 est à son tour reconnue par la sous-unité NBS1 du complexe MRN, ce qui induit le recrutement de ce complexe sur les histones H2AX adjacentes (98, 99). Le recrutement du complexe MRN permet à son tour de recruter un plus grand nombre de protéines ATM. Ces protéines ATM supplémentaires phosphorylent ensuite les histones H2AX adjacentes. La phosphorylation des histones H2AX se propage ainsi latéralement de part et d'autre du site de dommages. Cette phosphorylation est un mécanisme de signalisation du site de dommages qui permet notamment de concentrer les protéines du DDR au niveau de ce site.

ATM active par phosphorylation un grand nombre de substrats, incluant plusieurs médiateurs du DDR tels que la kinase CHK2 (*checkpoint kinase 2*) (94). En l'absence de

dommages à l'ADN, CHK2 est présente dans les cellules sous forme de dimère inactif. Lorsque la cascade du DDR s'active, ATM phosphoryle CHK2 sur la thréonine 68. CHK2 se dimérise ensuite et s'autophosphoryle sur plusieurs sites (100-102). Enfin, des monomères actifs de CHK2 sont libérés (101). Une fois complètement activée, CHK2 s'éloigne du site de dommages et amplifie la réponse cellulaire en phosphorylant à son tour de nombreux substrats. Parmi eux figure la protéine suppresseur de tumeur p53 (78). ATM peut également phosphoryler directement p53 (103). CHK2 tout comme CHK1 phosphoryle également plusieurs substrats impliqués dans le DDR, la mort cellulaire programmée ou encore le cycle cellulaire (104).

L'activation de la voie ATM conduit également à l'activation de plusieurs protéines impliquées dans des voies concurrentes de réparation des dommages à l'ADN telles que BRCA1 ou 53BP1. Le recrutement de 53BP1 repose sur un mécanisme complexe impliquant MDC1 (105). Une fois phosphorylée MDC1 est reconnue par l'ubiquitine ligase RNF8 (106). RNF8 s'associe ensuite avec l'enzyme UBC13, ce qui stimule l'ubiquitylation de l'histone H1 (107). Les histones H1 modifiées sont ensuite reconnues par l'ubiquitine ligase RNF168. Celle-ci ubiquitinye les histones H2A ce qui permet le recrutement de 53BP1 (108, 109). 53BP1 est ensuite phosphorylée par ATM, puis recrute à son tour un grand nombre de protéines du DDR (110). La voie ATM/CHK2 est essentielle pour la réponse aux dommages à l'ADN. En l'absence d'ATM, les cellules ne sont pas en mesure de stabiliser p53 et les points de contrôle du cycle cellulaire sont dysfonctionnels (111, 112).

#### **1.4.2.4 La voie de DNA-PK**

La voie médiée par la kinase DNA-PK peut tout comme la voie ATM/CHK2 être impliquée dans la réponse cellulaire aux bris double brin à l'ADN. Les protéines KU70 (*X-ray repair cross-complementing protein 6*) et KU80 (*X-ray repair cross-complementing protein 5*) forment un hétérodimère qui est en mesure de reconnaître les extrémités des cassures double brin. Cette association a lieu grâce à une interaction avec le squelette phosphate de l'ADN (113). L'hétérodimère Ku70-Ku80 associé aux extrémités libres de l'ADN a deux fonctions; d'une part, il permet de stabiliser les extrémités et d'éviter des réactions

indésirables; d'autre part, il joue un rôle de senseur ce qui permet le recrutement d'autres protéines du DDR telles que DNA-PK (114, 115). L'association de DNA-PK avec les extrémités libres de l'ADN et avec les protéines KU est nécessaire afin de renforcer son activité catalytique (116). DNA-PK phosphoryle plusieurs médiateurs ou effecteurs du DDR. Elle phosphoryle par exemple la plupart des protéines du mécanisme de réparation NHEJ (*Non-homologous end joining*) (117). DNA-PK phosphoryle également p53, H2AX ou encore la kinase CHK2 sous certaines conditions (118-120). Comme les autres PIKKs, DNA-PK a plusieurs sites d'autophosphorylation mais ceux-ci ne semblent pas impliqués dans son activation (18). Ainsi la voie de DNA-PK est primordiale pour la réponse aux dommages à l'ADN et plus particulièrement pour la prise en charge des cassures double brin.

### **1.4.3 Le DDR, un réseau interconnecté**

Dans un premier temps, par souci de clarté nous avons décrit les voies de réponse aux dommages à l'ADN de façon linéaire. Dans cette vision classique du DDR, les domaines d'action respectifs des différentes kinases sont bien définis et ne se chevauchent pas. De nombreuses études récentes ont cependant démontré que le DDR est en réalité constitué d'un ensemble de voies de signalisation interconnectées (94). La présence de bris simple brin active généralement la voie ATR/CHK1 et la présence de bris double brin active ATM/CHK2. Cependant, plusieurs évidences soutiennent l'activation concertée de ces différentes voies. Tout d'abord, les kinases proximales du DDR communiquent entre elles. En effet, il a été montré que DNA-PK et ATR sont en mesure de phosphoryler ATM sous certaines conditions (121, 122). Ensuite, les kinases proximales ATM et ATR sont toutes les deux capables d'activer par phosphorylation CHK1 et CHK2 (123, 124). Enfin, les kinases du DDR partagent de nombreux substrats communs (94). Par ailleurs, il arrive que les étapes intermédiaires d'une des voies en déclenchent une autre. Par exemple, les processus de réparation des bris simple brin induisent parfois des bris double brin. Dans ce cas, l'activation initiale de la voie ATR est suivie par l'activation de la voie ATM (125).

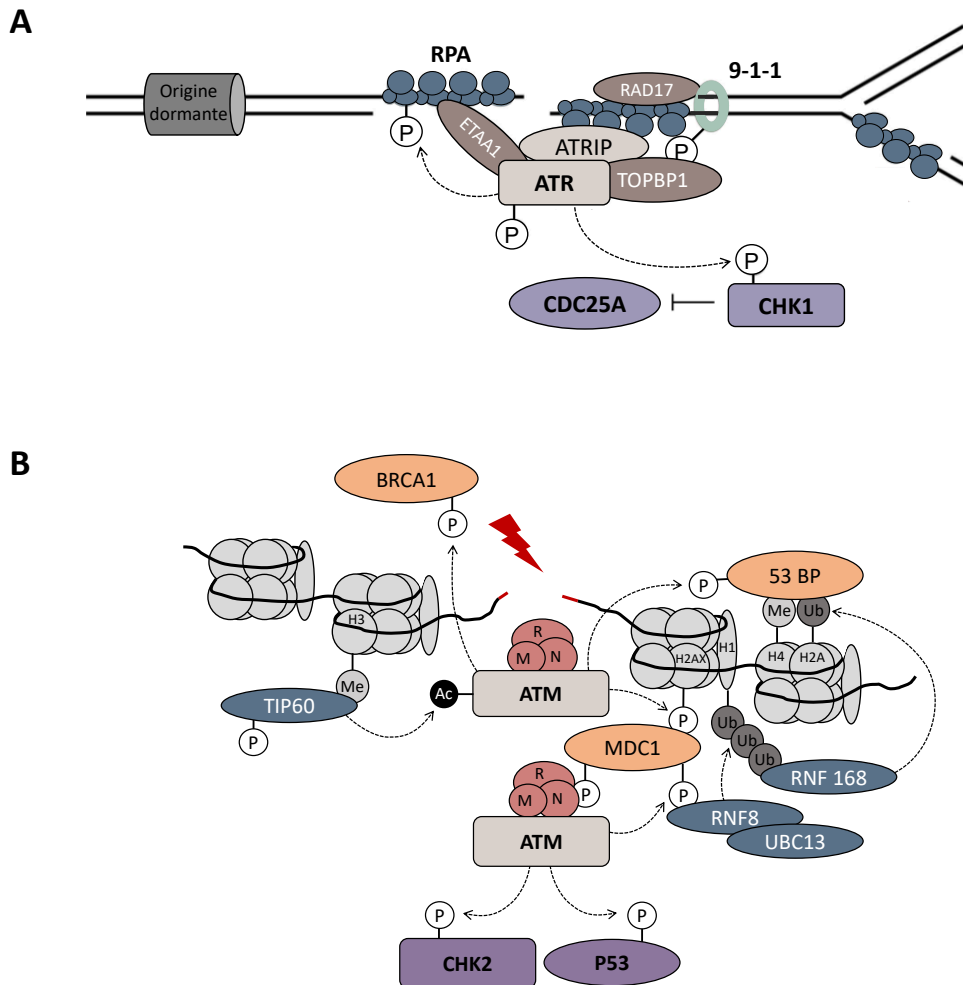


Figure 2. –

**Figure 2 : Cascade de réponse locale aux bris simple brin et aux bris double brin.**

Les bris à l'ADN engendrent le recrutement rapide de nombreuses protéines du DDR. Les cascades de signalisations locales de bris à l'ADN sont représentées ci-dessus. **(A)** La réponse aux bris simple brin est médiée par la kinase ATR. Les protéines RPA lient l'ADN simple brin. La protéine ARIP interagit avec les protéines RPA permettant le recrutement de ATR au site de dommage. TOPBP1, ETAA1 et le complexe 911 stimulent l'activation d'ATR. Une fois activée ATR phosphoryle CHK1 qui à son tour phosphoryle plusieurs substrats. CHK1 médie l'arrêt du cycle cellulaire au travers de la régulation des protéines de la famille CDC25. **(B)** La réponse aux bris double brin est médiée par la kinase ATM. Le complexe MRN (MRE11-NBS1-RAD50) permet le recrutement d'ATM au site de dommage. ATM phosphoryle les histones H2AX autour du site de dommages via un mécanisme dépendant de MDC1. ATM active plusieurs substrats incluant la kinase CHK2 et le facteur de transcription P53. Inspiré de : Blackford and Jackson 2017.

## 1.5 Conséquences cellulaires de l'activation du DDR

### 1.5.1 Le contrôle du cycle cellulaire

La croissance des organismes eucaryotes et leur reproduction dépendent de la division cellulaire. Les cellules eucaryotes se divisent via un processus appelé cycle cellulaire. C'est un mécanisme au cours duquel les cellules ainsi que leur matériel génétique se divisent en deux parties égales. La phase de division est précédée d'une phase de croissance. Le processus permet de former deux cellules filles identiques, ce mécanisme permet donc le maintien de l'information génétique (126). Lorsque des dommages à l'ADN surviennent, l'arrêt du cycle cellulaire est une des actions rapides que les cellules initient pour donner du temps à la mise en place des mécanismes de réparation (51).

#### 1.5.1.1 Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de 4 phases, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M (Figure 3). Les trois premières phases représentent l'interphase. Pendant cette période de croissance, les cellules se préparent à la mitose qui correspond à la phase de séparation du matériel génétique. La phase G<sub>1</sub> est une phase de croissance, la cellule synthétise les différentes macromolécules nécessaires à la phase de réplication (127). De nombreuses protéines sont synthétisées et la taille de la cellule eucaryote augmente (128). La phase S est la phase de réplication, elle est à l'origine de la duplication de l'ADN en deux molécules filles semblables. Ces deux molécules sont identiques autant sur le plan génétique que sur le plan structurel. La phase S est responsable, d'une part de la synthèse de la nouvelle molécule d'ADN, et d'autre part de la production et de la réorganisation des protéines d'empaquetage de la chromatine (129-132). Les modifications épigénétiques sont également transférées au brin néo-synthétisé (133). Les chromatides sœurs sont par la suite maintenues ensemble par les cohésines (protéines SMC : *structural maintenance of chromosomes protein*) (134). Nous verrons plus tard que ce point est essentiel lorsque certains mécanismes de réparation doivent être enclenchés. La phase G<sub>2</sub> permet quant à-t-elle d'augmenter la taille de la cellule en préparation de la mitose (129).

La mitose est une phase de division cellulaire qui permet la séparation du matériel génétique entre deux cellules filles (135). Elle se déroule en 4 phases successives, prophase, métaphase, anaphase, télophase. La cytotdiérèse termine le processus de division cellulaire en séparant physiquement les membranes cellulaires des deux cellules filles (135). La prophase consiste en l'alignement des molécules d'ADN progressivement condensées en deux chromatides sœurs. Les condensines qui sont des protéines à 5 sous unités ATP dépendantes participent à ce processus (135, 136). Lors de la pro-métaphase l'enveloppe nucléaire se rompt et les chromosomes sont attachés au fuseau mitotique par leurs kinétochores (135, 137). Ensuite, lors de la métaphase les chromosomes s'alignent sur le plan équatorial. Chaque chromatide sœur est ainsi attachée aux pôles opposés (135). L'anaphase correspond ensuite à l'ascension polaire des chromatides sœurs, cela permet leur ségrégation (135). Ce mécanisme est dépendant des moteurs du fuseau mitotique tels que les dynéines et les kynésines (138). La télophase correspond à l'assemblage de l'enveloppe nucléaire et à la décondensation des chromosomes (135). Ceci marque la fin du cycle cellulaire. La cytotdiérèse permet ensuite la division du cytoplasme en deux à l'aide d'un anneau contractile menant à la formation des deux cellules filles indépendantes (139).

#### **1.5.1.2 La régulation du cycle cellulaire : les complexes cycline-CDKs**

Le cycle cellulaire nécessite d'être finement régulé afin de garantir un processus de division normal. Les différentes étapes doivent être parfaitement synchronisées afin d'éviter une perturbation de la prolifération cellulaire. Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de la transition entre les phases du cycle cellulaire. Elles permettent de s'assurer que les différentes étapes se déroulent de façon séquentielle et unidirectionnelle (140).

Les CDKs (*cyclin-dependent kinases*) sont les principaux régulateurs du cycle cellulaire (141). Les CDKs, ont également de nombreuses fonctions à l'extérieur du cycle cellulaire (142, 143). Ces sérine/thréonine kinases ont besoin de former des hétérodimères avec les cyclines pour que leur activité kinase soit effective (144). Les cyclines sont des protéines exprimées de façon temporaire pendant le cycle cellulaire. Au contraire, les



CDKs sont exprimées de façon relativement stable pendant le cycle cellulaire (141). Le niveau des cyclines varie en fonction de leur synthèse et de leur dégradation (145). L'expression des cyclines est donc le facteur limitant de l'activité des complexes cycline-CDKs. De plus, d'autres facteurs entrent en jeu dans le contrôle de l'activité des complexes cycline-CDKs, leur localisation, leur état de phosphorylation, leur interaction avec des inhibiteurs, leur dégradation (146). Chez les mammifères, on retrouve une double spécificité d'association entre les CDKs et les cyclines (141).

L'initiation du cycle cellulaire se fait à partir d'un signal mitogène. Celui-ci est le plus souvent médié par les voies de transduction des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). Le signal mitogène est en général associé à un signal de croissance cellulaire (147). Cela entraîne la synthèse de cycline D (148). Celle-ci s'associe avec CDK4 et CDK6 et ces deux complexes phosphorylent la protéine suppresseur de tumeur RB (*Retinoblastoma-associated protein*) (149). La protéine RB se trouvait jusqu'alors dans état hypophosphorylée où elle réprimait le facteur de transcription E2F (150). Ce facteur de transcription est un régulateur cellulaire impliqué dans de nombreuses voies telles que le contrôle du cycle cellulaire, le contrôle de la réplication, les modifications de la chromatine ou encore l'apoptose (151-154). Dans le cadre du cycle cellulaire son activation primaire permet la synthèse de protéines favorisant la prolifération, dont la cycline E (155). La cycline E s'associe ensuite avec CDK2 et hyperphosphoryle la protéine pRB induisant une libération massive de E2F. Cela permet de passer le point de restriction G<sub>1</sub>/S et ainsi de rentrer en phase S (144). Le point de restriction est le point à partir duquel la cellule ne peut plus faire marche arrière. La présence d'un renforcement de la phosphorylation de pRB par le complexe cycline E-CDK2 est primordiale afin de garantir l'unidirectionnalité du cycle cellulaire. La cycline E est majoritairement dégradée au début de la phase S par un adressage au protéasome par le complexe SCF (*F-box containing complex*) (156). pRB reste quant à elle hyperphosphorylée jusqu'à la fin du cycle cellulaire où des phosphatases telles que PP1 la déphosphorylent (157).

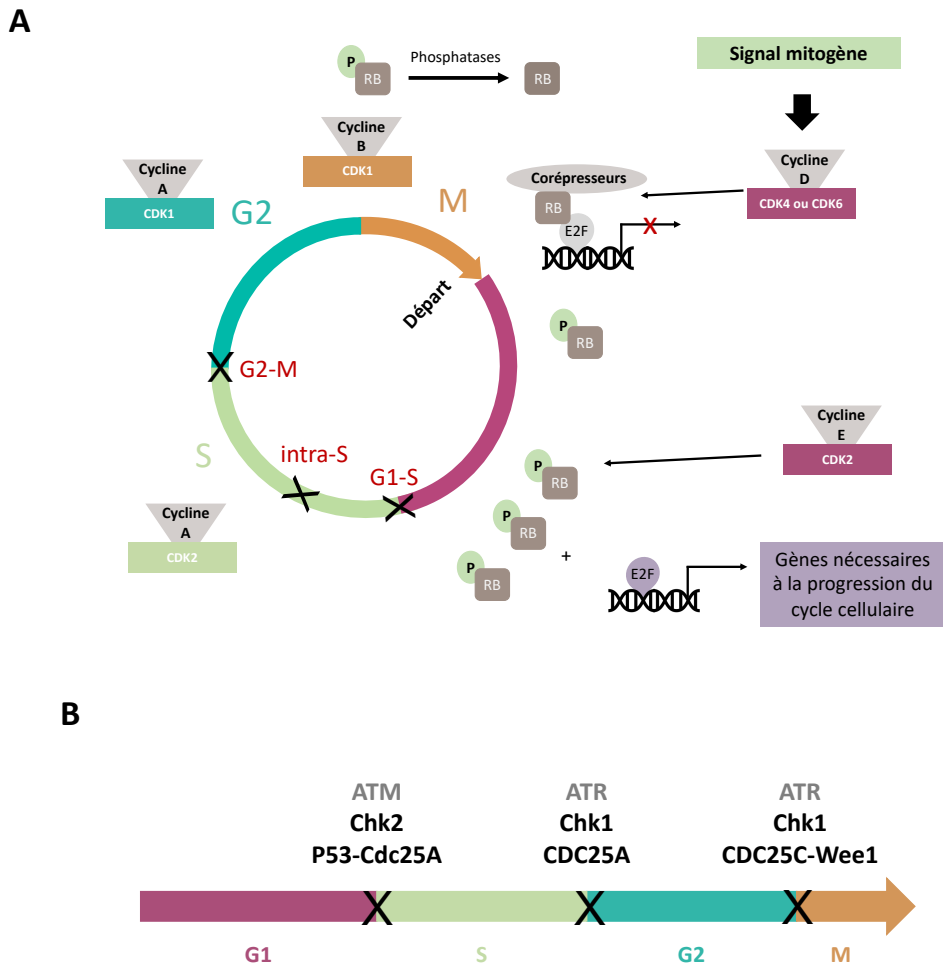


Figure 3. -

**Figure 3 : La signalisation du cycle cellulaire et de ses points de contrôle. (A)** La progression du cycle cellulaire est régulée par plusieurs complexes cycline-CDKs. Elle est représentée ci-dessus. Le cycle cellulaire débute par l'activation des complexes cycline D-CDK4-6 par un signal mitogène. Ces complexes phosphorylent ensuite la protéine RB. Cette phosphorylation régulatrice permet la libération du facteur de transcription E2F1. Cela induit l'expression de plusieurs gènes essentiels à la phase S incluant la cycline E. Le complexe cycline E-Cdk2 hyperphosphoryle RB favorisant l'entrée en phase S durant laquelle l'ADN est répliqué. Les complexes cyclin A-CDK2 et cyclin A-CDK1 contrôlent successivement la progression de la phase S et de la phase G<sub>2</sub>. Le complexe cyclin B-CDK1 est responsable de l'entrée et de la progression en phase M. La protéine RB est déphosphorylée en fin de phase M retournant ainsi à son état initial. **(B)** Il existe plusieurs points de contrôle où la progression du cycle cellulaire peut être interrompue. Le point de contrôle G<sub>1</sub>/S est majoritairement contrôlé par la voie

ATM/CHK2 alors que les points de contrôle intra-S et G<sub>2</sub>/M sont majoritairement régulés par la voie ATR/CHK1.

La cycline A est synthétisée dès la fin de la phase G<sub>1</sub>, elle est présente jusqu'au début de la mitose (158). Elle est dans un premier temps associée à CDK2. Cette association est nécessaire pour le déroulement de la phase S (141, 159). Le complexe est en partie responsable de la préparation de la réplication. Ensuite, la cycline A s'associe en fin de phase G<sub>2</sub> avec CDK1 pour le passage G<sub>2</sub>/M (141). Le complexe cycline A-CDK1 participe à la condensation précoce des chromosomes en phase G<sub>2</sub> (160).

La cycline B qui est synthétisée pendant la phase S, s'associe rapidement avec CDK1. Cependant le complexe est maintenu inactif par une phosphorylation inhibitrice par la kinase Wee1 (141, 161). Le complexe cycline B-CDK1 est nécessaire pour le passage de prophase à métaphase, pour

la formation du fuseau mitotique ainsi que pour la rupture de l'enveloppe nucléaire (160). En fin de phase G<sub>2</sub>, la phosphatase CDC25C retire le phosphate inhibiteur du complexe cycline B-CDK1 induisant son activation et l'entrée en mitose (162). La cycline B est ensuite dégradée par un adressage au système ubiquitine protéasome par le complexe APC/C (*anaphase-promoting complex*). L'inactivation du complexe est indispensable pour le passage en anaphase (163). Comme nous venons de le voir, le cycle cellulaire est composé d'un enchaînement d'étapes interdépendantes et il ne peut pas faire marche arrière une fois qu'il est lancé. On comprend dès lors qu'il est important que la cellule ait des mécanismes qui lui permettent de mettre en pause l'avancement du cycle cellulaire en cas de dysfonctionnement.

### **1.5.1.3 Le contrôle du cycle cellulaire dans un contexte de dommages à l'ADN**

Les cellules eucaryotes ont développé des voies de signalisation complexes permettant de mettre en pause le cycle cellulaire au cas où des problèmes surviendraient (164). En présence de dommages à l'ADN l'arrêt de la progression du cycle cellulaire repose majoritairement sur deux effecteurs, la protéine CDC25 et le facteur de transcription p53 (165, 166).

Il existe différents points de contrôle dans le cycle cellulaire où sa progression peut être interrompue sans conséquence. Les différents points de contrôle sont G<sub>1</sub>/S, intra-S, G<sub>2</sub>/M et intra-M (164). Le point de contrôle G<sub>1</sub>/S est extrêmement important, car il permet d'éviter une entrée en réplication si la cellule n'est pas prête pour cette phase cruciale (127). Le point de contrôle intra-S permet de réparer les dommages survenant pendant la phase de réplication; rappelons qu'il s'agit de la phase du cycle cellulaire la plus sujette à l'apparition de dommages (75). Le point de contrôle G<sub>2</sub>/M est particulièrement important, car il permet la réparation de dommages potentiellement survenus pendant la phase de réplication (167). Le temps de pause permet à la cellule d'évaluer les problèmes, de mettre en place des mécanismes de réparation ou bien d'activer des voies conduisant à la mort cellulaire et à la sénescence (164). Comme nous l'avons décrit plus tôt, la réponse aux dommages à l'ADN repose entre autres sur les voies ATR/CHK1 et ATM/CHK2.

Les kinases distales CHK1 et CHK2 jouent un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire. Elles phosphorylent toutes deux de nombreux substrats. Parmi eux plusieurs sont impliqués dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. CHK1 et CHK2 contrôlent notamment le point de contrôle G<sub>2</sub>/M. En présence de dommages à l'ADN, CHK1 phosphoryle Wee1. Cette phosphorylation induit la reconnaissance de Wee1 par la protéine 14-3-3, ce qui augmente son activité kinase. En complément, cette phosphorylation renforce la localisation nucléaire de Wee1. Wee1 inactive alors le complexe cycline B-CDK1 par une phosphorylation inhibitrice ce qui empêche l'entrée des cellules en mitose (168). De façon parallèle lorsque le DDR est activé, CHK2 et plus rarement CHK1, phosphorylent CDC25B et CDC25C. Une fois phosphorylées, ces deux phosphatases sont reconnues par la protéine 14-3-3 ce qui diminue leur activité catalytique. De plus, la phosphorylation induit la séquestration du complexe au cytoplasme. Ainsi CDC25B et CDC25C ne sont en mesure de retirer le phosphate inhibiteur du complexe cycline B-CDK1 permettant normalement l'entrée en mitose (169). Ces deux mécanismes renforcent donc le point de contrôle G<sub>2</sub>/M.

L'activation des kinases du DDR induit également un arrêt du cycle cellulaire aux points de contrôle G<sub>1</sub>/S ou intra-S. Lorsqu'elle est activée, CHK1 phosphoryle CDC25A, ce qui conduit à son adressage au protéasome par un complexe SFC. La phosphatase CDC25A est normalement responsable d'activer CDK2 en fin de phase G<sub>1</sub> ou au cours de la phase S. Ainsi, lorsque CDC25A est absente, l'entrée en phase S ou sa progression est bloquée (75, 76, 170).

De façon complémentaire, l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN induit le contrôle de cycle cellulaire au niveau transcriptionnel. Le DDR favorise la stabilisation du facteur de transcription p53 qui à son tour induit l'expression de nombreux régulateurs du cycle cellulaire. Parmi eux se trouve la protéine p21 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) qui est un inhibiteur des complexes cycline-CDKs (171, 172). p21 bloque l'initiation du cycle cellulaire par l'inhibition des complexes cycline D-CDK4-6 et cycline E-CDK2 (173).

### **1.5.2 L'activation des voies de réparation**

Très rapidement après l'apparition de dommages à l'ADN, des voies de réparation sont activées. Plusieurs voies existent et leur activation est dépendante du type de dommage détecté. Ces voies sont des éléments essentiels au maintien de l'intégrité du génome. Elles sont d'ailleurs mutées dans de très nombreux cancers ce qui laisse penser que leur dérégulation est associée à de telles pathologies.

Les trois kinases centrales des voies de réponse aux dommages à l'ADN [ATM, ATR et DNA-PK], sont en grande partie responsables de l'activation et du maintien des voies de réparation (50). Chacune de ces kinases phosphoryle plusieurs substrats directement impliqués dans les processus de réparation de l'ADN (94, 174). C'est également le cas de leurs kinases distales CHK1 et CHK2 (175, 176). La stabilisation de p53 en réponse à l'activation du DDR joue également un rôle important dans l'activation de ces voies (177). Ainsi les voies du DDR sont en mesure d'assurer la régulation des protéines de réparation à l'ADN au niveau transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel (178). D'autre part, elles participent à leur recrutement aux sites de dommage (50). L'inactivation des différentes kinases du DDR impacte sévèrement les capacités des voies de réparation

des dommages à l'ADN (179-181). La kinase ATR est impliquée plus spécifiquement dans l'initiation de la voie de recombinaison homologue, une voie centrale de la réponse au bris double brin (179, 181-183). Elle joue également un rôle dans l'activation des voies de réparation des *crosslinks* médiées par la protéine de la famille Fanconi (184). ATM et DNA-PK contrôlent quant à elles la résection de l'ADN autour du site de dommage, ce qui est une étape cruciale pour le choix de la voie de réparation des bris double brin (185). Elles régulent également toutes deux la voie de réparation NHEJ des bris double brin (186). ATR et ATM régulent également les voies de réparation BER (*Base excision repair*), NER (*Nucleotide excision repair*) et MMR (*Mismatch repair*) (50). De façon parallèle l'activation du DDR favorise le remodelage de la chromatine autour du site de dommage, facilitant ainsi le recrutement et l'activité de ces différentes protéines de réparation (187, 188). Nous verrons les mécanismes détaillés de ces voies plus loin.

### **1.5.3 Le contrôle de la réplication**

La réplication de l'ADN est une étape cruciale pour la prolifération cellulaire. C'est un processus hautement régulé dans lequel de nombreux complexes protéiques doivent fonctionner de façon coordonnée (189). Bien qu'essentielle pour la division cellulaire, la réplication peut aggraver des dommages à l'ADN déjà présent ou même favoriser l'apparition de nouveaux. Les cellules sont constamment exposées à plusieurs sources de stress répliatif, ce qui peut entraîner in fine un effondrement de la fourche de réplication (190, 191). Il est par exemple fréquent que la fourche rencontre des bris simple brin. Dans ce cas, le passage de la machinerie de réplication transforme souvent ces bris simple brin en bris double brin (191). Ceux-ci sont nettement plus dramatiques pour l'avenir de la cellule (17). Lorsque des dommages surviennent pendant la réplication, il est important que les cellules prennent des mesures immédiates afin de stabiliser la fourche de réplication. Cela permet d'éviter un effondrement de celle-ci et des dommages supplémentaires (190). Lorsque la fourche se trouve bloquée, elle est sujette à la dégradation par des nucléases ce qui entrave son redémarrage (190). Les cellules ont à leur disposition différents mécanismes afin de stabiliser et de favoriser le redémarrage de la fourche pour compléter la phase S.

Les kinases centrales du DDR sont impliquées dans la régulation de ces étapes. ATR et CHK1 phosphorylent plusieurs substrats afin d'éviter la destruction de la fourche (50). C'est par exemple le cas de la protéine EXO1 (*Exonucléase 1*). Cette exonucléase lorsqu'elle n'est pas régulée peut favoriser la fragmentation des chromosomes en présence de blocage de la fourche de réplication. En présence d'arrêts prolongés de la fourche de réplication, ATR phosphoryle EXO1 ce qui induit sa dégradation (192). De façon complémentaire, CHK1 phosphoryle EXO1, qui est ensuite reconnue par la protéine 14-3-3, ce qui change sa localisation et l'éloigne des chromosomes (193). L'activation de la voie ATR/CHK1 favorise également le recrutement de plusieurs hélicases à proximité de la fourche de réplication bloquée ce qui évite son effondrement et favorise son redémarrage. C'est par exemple le cas de WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*), BLM (*Bloom syndrome protein*), et SMARCAL1 (194-197).

De façon parallèle, la voie ATR/CHK1 induit un ralentissement général de la réplication de l'ADN. Ce mécanisme est essentiel afin d'éviter la saturation du système de surveillance et de réponse aux dommages (198). Le contrôle de la réplication en présence de dommages à l'ADN passe en grande partie par l'inhibition des origines de réplication tardives (199). Lorsque CHK1 est activée, elle s'associe avec la protéine Treslin et la phosphoryle. Cette association empêche la protéine Treslin de recruter CDC45 sur le complexe d'initiation de la réplication (200). Le recrutement de ce complexe est indispensable pour l'activation des hélicases MCM et le départ du réplisome (201). De façon complémentaire, CHK1 induit l'activation des phosphatases de la famille CDC25. Cela conduit à une diminution de l'activation des CDKs, elles aussi nécessaires pour l'activation du complexe de réplication (202, 203). Grâce à ce mécanisme, l'activation de la voie ATR/CHK1 empêche le démarrage de nouvelle origine de réplication. Malgré cette diminution globale de la réplication, il est fréquent que des origines de réplication à proximité directe du site de dommages soient activées afin de garantir la synthèse de l'ADN dans cette zone (198). La stabilisation de la réplication permet d'éviter l'aggravation des dommages à l'ADN et favorise un retour des cellules vers un état normal.

La rencontre de dommages à l'ADN pendant la réplication perturbe de façon transitoire sa synthèse. Au vu du grand nombre de dommages auxquels les fourches sont confrontées, les voies de réparation ne sont pas toujours déclenchées immédiatement. Les dommages à l'avant de la fourche peuvent être temporairement tolérés afin de ne pas retarder la réplication. Ainsi, deux voies cellulaires permettent de contourner les dommages à l'ADN (204). Le premier mécanisme utilise la recombinaison homologue. Il permet de passer outre le dommage en prenant temporairement pour modèle la chromatide sœur. Ce mécanisme permet à la fourche de dépasser le dommage tout en préservant une information génétique fidèle (205). Le second mécanisme fait appel à des polymérases de translésion. Dans ce cas, les polymérases classiques ( $\epsilon$ ,  $\delta$ ) sont remplacées de façon temporaire par une polymérase de translésion. Ces polymérases très peu fidèles sont en mesure d'ajouter un nucléotide en regard du site de dommages. Le manque de fidélité de ce mécanisme augmente le risque de mutation (206). Quel que soit le mécanisme post-réplicatif employé, le dommage sur le brin parental est réparé après le passage de la fourche de réplication (204).

#### **1.5.4 Le contrôle du métabolisme cellulaire**

Le métabolisme cellulaire doit en permanence s'adapter aux besoins des cellules. De nombreuses voies métaboliques sont régulées en réponse à l'activation du DDR afin de faciliter le retour à la normale. Le niveau de dNTP doit par exemple être régulé. Un niveau suffisant de dNTP est nécessaire pour le bon déroulement de la réplication. Une augmentation du niveau de dNTP mène à une diminution de la fidélité des ADN polymérases. Au contraire, la diminution du niveau de dNTP favorise l'arrêt de la progression des fourches de réplication et l'activation du DDR. Le ratio entre les différents dNTP est lui aussi important. De façon notable, les dNTP sont également nécessaires au processus de réparation de l'ADN y compris hors de la phase de réplication. Maintenir un niveau de dNTP suffisant hors de la phase S est un défi pour les cellules. Un manque de dNTP peut empêcher la réparation complète des lésions (207, 208). Chez les mammifères, la synthèse des dNTP est principalement contrôlée par la ribonucléotide réductase (RNR). En présence de dommages à l'ADN, ATM, ATR et p53 favorisent la synthèse des sous-unités nécessaires à formation de cette enzyme. De



façon générale, l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN induit une augmentation du niveau de dNTP disponibles. De façon notable, il a été rapporté qu'en présence de dommages à l'ADN la ribonucléotide réductase se relocalise au noyau afin de produire des dNTP localement. Cette augmentation locale de la concentration est utile pour soutenir les mécanismes de réparation (209).

Par ailleurs, lorsque des dommages surviennent en phase S, la quantité d'histone disponible doit être finement régulée. Les histones sont normalement très abondantes en phase S afin d'empaqueter l'ADN nouvellement synthétisé (210). Lorsque le DDR est activé, la vitesse de synthèse de l'ADN est globalement diminuée. Les histones libres risquent alors de s'accumuler. Les histones libres ont une très forte affinité non spécifique pour l'ADN. Si elles sont présentes en trop grande quantité elles induisent la formation d'agrégats ce qui mène à une augmentation du stress répliatif. Afin de pallier cette situation, les histones libres sont couplées à des protéines chaperonnes telles que ASF1A (211). Chez les mammifères, les mécanismes de régulation du niveau d'histones par le DDR restent encore mal caractérisés. Il a cependant été rapporté qu'en présence de stress répliatif la protéine de liaison à l'ARN (*Acide ribonucléique*) SLBP (*Histone RNA hairpin-binding protein*) et UPF1 facilitent la dégradation des ARNm (*ARN messenger*) d'histone (212, 213). Ce mécanisme semble être médié par les PIKKs du DDR (214). La régulation des histones libres par le DDR est mieux caractérisée chez les levures. Il a par exemple été montré que la protéine RAD53 qui est l'homologue de CHK2 favorise la dégradation des histones libres en présence de stress répliatif (215).

Les protéines RPA jouent quant à elles un rôle central dans la stabilisation de l'ADN simple brin. L'accumulation de protéine RPA sert de support à l'activation de la cascade de réponse aux dommages à l'ADN. Les RPA soutiennent également les processus de réparation des dommages (216). Un manque de protéine RPA induit une augmentation de l'instabilité génomique. Il est primordial que la quantité de protéine RPA disponible dans les cellules soit suffisante (217). Leur niveau cellulaire est principalement régulé par la kinase ATR. Celle-ci maintient un niveau minimal de RPA en inhibant le départ

simultané d'un trop grand nombre d'origine de réplication. Cela contribue directement à éviter leur épuisement (218).

### **1.5.5 Le contrôle de la transcription et du métabolisme des ARN**

L'activation des voies du DDR a différents effets sur la transcription des gènes. Il a été rapporté que la transcription globale diminue en présence de dommages à l'ADN. Cette répression est en partie médiée par un contrôle de l'ARN polymérase II par les protéines du DDR. ATM et DNA-PK induisent par exemple sa dégradation protéasomale (219, 220). L'inhibition de la transcription est renforcée par des actions au niveau de la chromatine. Ainsi, il a été montré que ATM réprime la chromatine aux alentours des sites de dommages (221). La diminution globale de la transcription contribue entre autres à éviter les collisions entre la machinerie de transcription et celle de réparation.

À l'opposé, la transcription de certains gènes est augmentée en réponse aux dommages à l'ADN (222). En effet, comme nous l'avons vu plus tôt, l'activation du DDR repose sur l'expression de plusieurs gènes. Cette réponse transcriptionnelle est nécessaire pour la signalisation des dommages à l'ADN ainsi que pour leur réparation. Ces réponses transcriptionnelles sont en grande partie médiées par les facteurs de transcription p53 et E2F (223-225).

Plus récemment, plusieurs équipes ont mis en évidence que des ARN non codants sont transcrits en présence de dommages à l'ADN (226). Tout d'abord, il a été montré que des miRNA (*micro RNA*) sont produits et qu'ils supportent la réponse aux dommages à l'ADN (226). Ensuite, il a été rapporté que des ARN courts sont synthétisés à proximité immédiate des bris à l'ADN par la polymérase IV. Ce mécanisme est contrôlé par des kinases du DDR telles que ATR (227). La synthèse de ces petits ARN non codants supporte l'activation du DDR et participe au recrutement d'autres facteurs du DDR (228). Enfin, il a été découvert que des longs ARN non codants sont transcrits par l'ARN polymérase II à proximité directe des zones de bris à l'ADN. Leur production semble nécessaire pour la mise en place des mécanismes de réparation (229). Il est maintenant clair que la transcription et le métabolisme des ARN sont modulés en réponse aux dommages à l'ADN.

### 1.5.6 La communication extracellulaire

Les cellules qui subissent des dommages à l'ADN communiquent avec l'environnement extérieur. Cette communication a lieu par deux mécanismes distincts, l'un fonctionne à court terme alors que le second fonctionne à long terme (230). La présence d'un mécanisme de communication immédiate est supportée par l'existence de l'*effet bystander*. En effet, il a été observé que lorsqu'une cellule est irradiée, les cellules voisines non exposées présentent un phénotype de dommage à l'ADN (231, 232). Le mécanisme précis qui permet aux cellules de communiquer de façon immédiate n'a pas été pleinement caractérisé. Il semble cependant que le transfert de ROS via les jonctions intercellulaires entre les cellules endommagées et les cellules voisines soient impliqués. Il semble également que cette communication rapide puisse être médiée par l'intermédiaire de récepteurs de surface (230). Enfin, il a été rapporté que les exosomes pourraient jouer un rôle dans la communication rapide avec les cellules voisines ainsi que dans l'activation du DDR dans ces cellules (233-235). Les exosomes sont des petites vésicules excrétées qui participent à de nombreux processus cellulaires. Ils contiennent entre autres des protéines, des fragments d'ADN, des ARN non codants ou encore des ARNm (236). Leur possible implication dans la communication entre cellules en présence de dommages à l'ADN n'est donc pas surprenante.

Par ailleurs, il a été montré que les cellules communiquent avec leur environnement selon un mode à long terme. En effet, dans certains cas les dommages à l'ADN induisent le déclenchement de la sénescence cellulaire. Nous en discuterons dans un chapitre dédié à la sénescence. Les cellules sénescents ayant des dommages à l'ADN persistants excrètent des molécules appelées SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*). Il semble que les SASP participent à la communication intercellulaire à la suite de l'apparition de dommages à l'ADN. L'expression de plusieurs SASP est d'ailleurs médiée par des protéines du DDR (230, 237). La communication intercellulaire médiée par le DDR qu'elle soit rapide ou lente contribue à l'établissement d'une réponse tissulaire coordonnée.

## 1.6 La réparation des dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN non réparés même mineurs, peuvent s'aggraver et être délétères pour les cellules (5). Plusieurs voies sont impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN chez les mammifères (Figure 4). Le mécanisme déployé par la cellule dépend du type de dommage et de son origine. Certaines voies de réparation ne sont utilisées que lors d'une phase spécifique du cycle cellulaire alors que d'autres sont perpétuellement actives. Bien que la réparation des dommages à l'ADN permette de limiter les dégâts pour le devenir cellulaire, elle ne permet pas toujours de rétablir une copie parfaite de l'ADN (238).

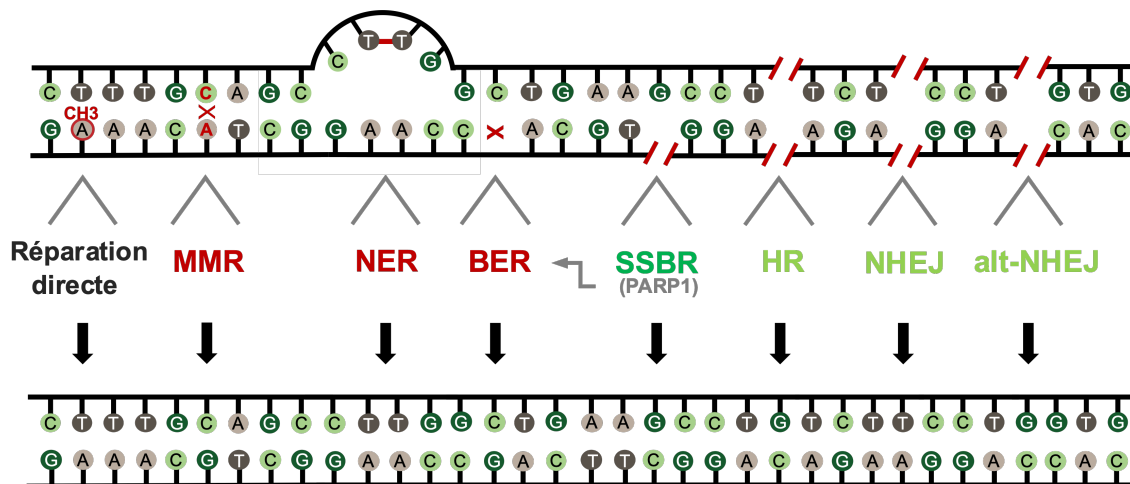


Figure 4. →

### Figure 4 : Principales voies de réparation des dommages à l'ADN.

Il existe plusieurs mécanismes cellulaires dédiés à la réparation des dommages affectant la double hélice d'ADN. Ces différents mécanismes sont dépendants du type de dommages rencontrés. Les principales voies de réparation ainsi que le type de dommages qu'elles prennent en charge sont représentés ci-dessus. La réparation directe permet de retirer les modifications non désirées de bases azotées. Le mécanisme MMR (*Mismatch Repair*) prend en charge les mésappariements qui surviennent lors de la réplication de l'ADN. Le mécanisme NER (*Nucleotide excision repair*) s'occupe de réparer les dommages qui induisent des torsions de l'ADN. Le mécanisme BER (*Base excision repair*) permet de réparer les sites abasiques et les bris simple brin. Le mécanisme SSBR (*Single Strand Break Repair*) est utile pour réparer les bris simple brin à l'ADN. Enfin, la recombinaison homologue (HR), le mécanisme NHEJ (*Non-homologous end joining*) et alt-NHEJ (*Alternative non-homologous end-joining*) permettent de réparer les bris double brin à l'ADN. Ces différents mécanismes sont contrôlés par le DDR et ils agissent de façon concertée. Inspiré de : (Hakem 2008)

### 1.6.1 La réparation des altérations de base et des bris simple brin

Comme nous avons vu plus tôt les altérations des bases de l'ADN sont fréquentes. Plusieurs de ces modifications sont réparées par des mécanismes directs. Ces voies de réparation sont dépendantes du type de dommages et n'impliquent pas de clivage de la double hélice d'ADN. De façon générale, peu d'acteurs et un nombre réduit d'étapes sont nécessaires à leur mise en place. Ces voies de réparation rétablissent la séquence d'origine sans induire d'erreur (239).

Il est courant que des erreurs surviennent pendant la réplication de l'ADN (189). Ces erreurs sont prises en charge par le mécanisme de réparation des mésappariements (MMR: *Mismatch repair*). Le MMR est actif uniquement au cours de la phase S. Le brin néosynthétisé est réparé de façon fidèle en prenant modèle sur le brin parent. La distinction entre ces deux brins est réalisée grâce à l'absence de méthylation sur le brin qui est en cours de synthèse. Plusieurs protéines sont impliquées dans la voie du MMR. Le complexe protéique MSH2-MSH6 est le premier à reconnaître le site de dommage. Le dimère MHL1-PSM2 est ensuite recruté afin de consolider le processus de réparation. Puis une exonucléase telle que EXO1 est recrutée afin d'exciser les paires de bases à remplacer. Une polymérase resynthétise ensuite l'ADN et une ligase joint les extrémités (240).

Le mécanisme BER (*base excision repair*) permet de réparer les bases anormales, ou les adduits. Ce mécanisme est actif tout au long du cycle cellulaire (241). Le mécanisme BER induit un clivage simple brin de l'ADN qu'il répare ensuite. Cela explique le fait que les dernières étapes de ce mécanisme soient également utilisées pour la réparation des bris simple brin spontanés (15). La première étape de cette voie de réparation consiste à identifier le site de dommage par une glycosylase qui clive la base altérée et crée ainsi un site abasique. L'endonucléase APE1 reconnaît ensuite le site abasique et induit un bris simple brin à l'ADN. Les extrémités sont par la suite modifiées afin d'éliminer le sucre et le phosphate respectivement en 5' et en 3' du bris. Puis, la polymérase beta ajoute une nouvelle base en prenant le second brin comme modèle; cela garantit la fidélité de la réparation. Sous certaines conditions, la synthèse de l'ADN n'est pas directement

possible et une résection supplémentaire est nécessaire. Pour finir, une ligase restaure les liens phosphodiester aux extrémités (242). En outre, lorsqu'un bris simple brin survient aléatoirement, un mécanisme similaire, appelé SSBR (*Single-stranded break repair*), le prend en charge. La protéine PARP1 (*Poly (ADP-ribose) polymerase 1*) reconnaît le site de dommage et recrute XRCC1 (*DNA repair protein XRCC1*) ce qui sert de support au recrutement des autres protéines nécessaires telles que APE1 (*AP endonuclease 1*) et PNK (*Polynucleotide phosphatase*). La suite du mécanisme est similaire à celui de la voie BER (15).

Le mécanisme NER est utile pour la réparation des lésions impliquant une distorsion de la double hélice d'ADN. Ce type de structure est le résultat de la présence d'adduits de bases et des photo-produits comme les dimères de thymine (238). Les lésions sont reconnues initialement par le complexe protéique XPC-RAD23B-CETN2. Le complexe multi-protéique TFIIH (*Transcription factor II H*) est ensuite recruté au site de dommages. TFIIH possède une activité hélicase qui lui permet d'ouvrir la double hélice d'ADN de part et d'autre de la lésion. Les protéines RPA sont parallèlement recrutées afin de protéger l'ADN simple brin. Une fois que la zone de dommages est stabilisée, TFIIH médie le recrutement du complexe XPF-ERCC1 qui possède une activité endonucléase. Ce complexe incise le bris affecté en 5' du dommage. Par la suite, l'endonucléase XPG (*Xeroderma pigmentosum group G-complementing protein*) qui a été préalablement recrutée clive l'ADN en 3' de la lésion. La zone ainsi excisée est comprise entre 20 et 30 nucléotides. Enfin, une polymérase resynthétise la partie manquante et une ligase restaure les liaisons phosphodiester (243). Ce mécanisme est fidèle et il est actif tout au long du cycle cellulaire (241). Une variante du mécanisme appelé TC-NER est utilisée pour réparer les lésions qui impliquent un blocage de l'ARN polymérase II pendant la transcription. L'activation du mécanisme est dans ce cas directement médiée par le complexe de transcription. Les étapes suivantes sont communes avec celles de la voie classique (243).

### 1.6.2 La réparation des bris double brin

Les cellules sont aussi régulièrement confrontées à des bris double brin à l'ADN. Ceux-ci sont extrêmement délétères. Deux grandes voies sont impliquées dans leur réparation. Il s'agit de la recombinaison homologue et du mécanisme NHEJ. Ces deux mécanismes de réparation sont très différents autant dans leur mode d'action que dans leur résultat. En effet, la recombinaison homologue permet de réparer l'ADN de façon fidèle alors que le mécanisme NHEJ est susceptible d'induire des erreurs lors de la réparation (244). Ces deux voies sont en compétition pour la réparation des bris double brin à l'ADN. Une des étapes pivot dans le choix de l'un ou l'autre de ces mécanismes est le démarrage ou non d'un processus de résection de l'ADN. La balance entre les médiateurs 53BP1 et BRCA1 est particulièrement importante. BRCA1 favorise la résection de l'ADN et la recombinaison homologue. À l'opposé 53BP1 la réprime et favorise le mécanisme NHEJ (17). Le choix du mécanisme est également dépendant de la progression du cycle cellulaire. En effet, la recombinaison homologue n'est disponible que pendant les phases S et G<sub>2</sub>. Au contraire, le mécanisme NHEJ est disponible tout au long du cycle cellulaire avec une activité maximum en phase G<sub>1</sub> (17, 241). Le mécanisme NHEJ implique le recrutement de l'hétérodimère Ku70-Ku80 et de la kinase DNA-PK au site de dommage. Si nécessaire les extrémités de l'ADN sont modifiées par des nucléases. Une polymérase resynthétise ensuite l'ADN et une ligase restaure les liaisons phosphodiester (245).

Dans le cas où le processus de résection est enclenché, il se divise en deux étapes. La phase initiale est médiée par les nucléases MRE11 (complexe MRN) et CtIP. Cette phase initiale consiste à retirer quelques paires de bases. Une seconde phase plus étendue est ensuite médiée par la nucléase EXO1 avec le support des hélicases BLM et WRN (246). La recombinaison homologue est alors possible. Ce mécanisme garantit la fidélité des réparations en utilisant la chromatide sœur comme modèle. L'invasion de la chromatide sœur est médiée par la protéine RAD51. Celle-ci s'accumule aux sites de dommage et stimule l'échange de brin nécessaire pour la recombinaison (17). Dans le cas où une résection a été réalisée, deux voies alternatives à la recombinaison homologue peuvent être utilisées. Il s'agit des mécanismes alt-EJ (*alternative end joining*) et SSA (*single-strand annealing*). Le premier est similaire au NHEJ mais il ne nécessite que la première

phase de résection. Il repose sur la formation de microhomologie entre les deux extrémités d'ADN. Le second nécessite la présence de deux longues séquences similaires sur chaque brin afin de former une large zone d'homologie. Ces deux mécanismes ne garantissent pas la fidélité de la réparation (245).

En outre, il arrive que des *crosslinks* inter-brin se produisent dans l'ADN. Ces lésions complexes sont réparées via différents mécanismes. Le mécanisme employé est dépendant du cycle cellulaire. En phase G<sub>1</sub>, les *crosslinks* sont réparés par le mécanisme NER. Au contraire, pendant les phases S et G<sub>2</sub>, ils sont pris en charge par un mécanisme dépendant à la fois des protéines de la famille FANCONI et de la recombinaison homologue. Ce mécanisme repose principalement sur la reconnaissance des *crosslinks* par la protéine FANCM (*Fanconi anemia group M protein*). Celle-ci induit le recrutement des autres protéines de la famille Fanconi, et notamment du complexe FANCD2-FANCI. Cette étape est suivie par le recrutement de nucléases, d'hélicases et de polymérases de translésion. Elles participent ensemble au démantèlement de la jonction inter-brin. Enfin, la recombinaison homologue est utilisée afin de terminer la réparation (247).

## **1.7 L'inactivation des voies de réponse aux dommages à l'ADN**

Dans le cas où les dommages à l'ADN sont totalement réparés, il est important d'inactiver les protéines de la cascade du DDR. Cela permet aux cellules de retrouver un état normal. Deux phosphatases sont impliquées dans l'inactivation des kinases du DDR. Les phosphatases PPM1D (*Protein phosphatase 1D*) et PP2A (*Protein phosphatase 2*) déphosphorylent ATR, ATM, CHK2, CHK1 et p53 (248-250). Elles déphosphorylent parallèlement les histones  $\gamma$ H2AX (251, 252). En complément, l'E3 ubiquitine ligase MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*) induit la dégradation protéasomale de p53. L'expression de PPM1D et MDM2 est régulée positivement par p53 au niveau transcriptionnel. Ces deux protéines participent donc à la rétroaction négative de p53 (253, 254). D'autres protéines intermédiaires du DDR comme les Claspins ou Wee1 sont dégradées via le protéasome afin de libérer les points de contrôle (169). Les protéines CDC25 sont également déphosphorylées par PP2A, ce qui permet l'activation des complexes cycline -CDKs et favorise la reprise du cycle cellulaire (255).



## **1.8 Échec des mécanismes de réparation et devenir cellulaire**

Il arrive que la quantité ou que la complexité des dommages ne permette pas leur réparation adéquate dans un temps raisonnable. Dans ce cas, les cellules limitent la propagation des dommages par le déclenchement de processus qui évitent de nouvelles divisions cellulaires. Les deux mécanismes fréquemment initiés sont l'apoptose, qui induit la mort de la cellule de façon programmée et la sénescence qui induit un arrêt de prolifération cellulaire définitif. Ces deux mécanismes empêchent la transmission de matériel génétique altéré et ont ainsi un rôle suppresseur de tumeur (3).

### **1.8.1 L'apoptose : la voie de mort cellulaire programmée**

La persistance ou l'accumulation de dommages à l'ADN non réparés peut conduire au déclenchement de l'apoptose (256). C'est une voie centrale de la mort cellulaire programmée. Elle permet d'éliminer les cellules endommagées avant qu'elles ne propagent une information génétique altérée (257). Cette neutralisation des cellules défectueuses a lieu sans altérer le tissu avoisinant. Cela contribue ainsi directement au maintien de l'homéostasie cellulaire (258). Les cellules apoptotiques présentent des changements morphologiques caractéristiques. On retrouve par exemple un bourgeonnement de la membrane plasmique, la formation de corps apoptotiques, la condensation de la chromatine et la fragmentation de leur l'ADN (259). Le déclenchement de l'apoptose est un évènement hautement régulé. Une dérégulation de ce processus est à l'origine de nombreux dysfonctionnements cellulaires (260, 261). La balance entre facteurs anti-apoptotiques et facteurs pro-apoptotiques est un des éléments pivot du déclenchement de l'apoptose (262). Une fois déclenché, le processus d'apoptose n'est que rarement interrompu (263, 264). Deux voies cellulaires peuvent supporter l'initiation de l'apoptose (Figure 5). Il s'agit de la voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale et la voie extrinsèque, dépendante d'un signal extérieur (258). Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases qui sont des protéases majeures de l'apoptose (265).

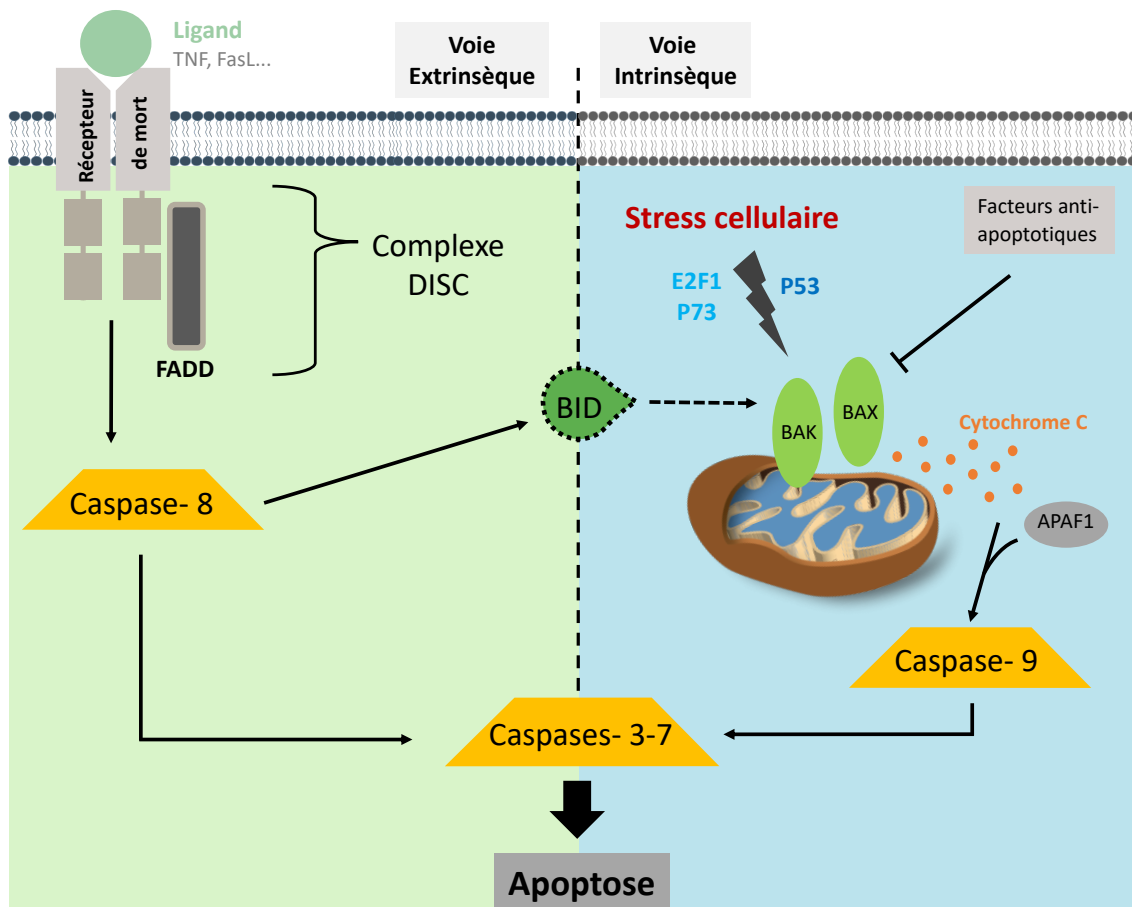


Figure 5. –

### Figure 5 : Régulation du déclenchement de l'apoptose.

Deux voies de signalisation distinctes peuvent déclencher l'apoptose. Ces deux voies sont schématisées ci-dessus. La voie extrinsèque (à gauche) est activée par un signal extracellulaire. La stimulation d'un récepteur membranaire induit l'activation de la caspase 8. La voie intrinsèque (à droite) est déclenchée par un stress cellulaire. Les protéines BAK et BAX favorisent la libération du cytochrome C mitochondrial. Celui-ci s'associe avec la protéine APAF1 et ensemble ils stimulent l'activation de la caspase 9. L'activation des caspases régulatrices 8 et 9 mène à l'activation des caspases exécutrices 3 et 7. L'activation de la voie extrinsèque peut conduire à l'activation de la voie intrinsèque par l'intermédiaire de la protéine BID (*BH3 interacting-domain death agonist*). Inspiré de : (McArthur and Kile 2018).

#### 1.8.1.1 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose est activée en réponse à un signal intracellulaire. C'est la voie la plus courante d'initiation de l'apoptose. La voie intrinsèque est déclenchée en réponse à diverses situations de stress cellulaire incluant l'accumulation de dommages

à l'ADN (256). Son initiation repose sur un équilibre entre protéines pro-apoptotiques et protéines anti-apoptotiques. Deux des éléments centraux de ce mécanisme sont les protéines pro-apoptotiques BAX (*Bcl-2-associated X protein*) et BAK (*Bcl-2 homologous antagonist killer*). Elles appartiennent toutes deux à la famille des protéines BCL2 (262). En présence de signaux apoptogènes, la protéine BAX se relocalise à la membrane externe mitochondriale où elle s'oligomérisse avec la protéine BAK (266). Cette association mène à la formation de pores et ainsi à la libération du cytochrome C dans le cytoplasme (267, 268). Le cytochrome C libéré s'associe ensuite avec la protéine Apaf1 pour former l'apoptosome. Ce complexe active la procaspase 9 et favorise la poursuite de la réponse apoptotique (269).

Comme nous l'avons vu plus tôt, la présence de dommages à l'ADN persistants induit la stabilisation de la protéine p53 (172, 270). La stabilisation de ce régulateur transcriptionnel clé du DDR mène à l'activation de plusieurs protéines pro-apoptotiques. Parmi elles se trouve la protéine PUMA (271, 272). Cette protéine de la famille BCL2 induit la relocalisation de BAX à la membrane mitochondriale et in fine la libération de cytochrome C dans le cytoplasme (273). Parallèlement, l'activation du DDR conduit à une stabilisation du facteur de transcription E2F1 dépendante de la kinase CHK1. E2F1 médie ensuite la stabilisation de la protéine P73 (274). Ce facteur de transcription est en mesure d'augmenter la transcription des protéines PUMA, BAX et NOXA (275). Comme pour la voie dépendante de p53, l'augmentation de PUMA stimule la relocalisation de BAX à la membrane mitochondriale induisant la libération du cytochrome C. L'activation de NOXA permet quant à elle de déstabiliser la membrane mitochondriale (276). La voie de P73 est en mesure d'induire l'apoptose de façon indépendante de p53 (277).

### **1.8.1.2 La voie extrinsèque**

La voie extrinsèque est activée suite à la réception d'un signal extracellulaire par un récepteur membranaire. Trois couples ligand-récepteur sont principalement impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose. Il s'agit du récepteur TNFR et de son ligand le TNF alpha (*Tumor necrosis factor receptor et Tumor necrosis factor*); du récepteur FAS et de son ligand FASL (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*); et du

récepteur TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et de ces ligands DDR4 et DDR3. L'activation des récepteurs conduit au recrutement intracellulaire de la protéine FADD (*FAS-associated death domain protein*). Ensemble ils forment le complexe DISC (*Death-inducing signaling complex*). Ce complexe permet l'activation des caspases 8 par auto-protéolyse. Les caspases 8 activent par la suite les caspases effectrices pour poursuivre l'apoptose (278, 279). De façon parallèle, les caspases 8 clivent les protéines BID (*BH3 interacting-domain death agonist*). Une fois clivées, ces protéines de la famille BCL2 se relocalisent à la mitochondrie où elles interagissent ensuite avec BAK et BAX. Cette interaction active la voie intrinsèque de l'apoptose (280). Ainsi une activation initiale de la voie extrinsèque se poursuit par l'activation de la voie intrinsèque.

### **1.8.1.3 Les caspases, des éléments centraux de l'apoptose**

Les caspases sont des protéases à cystéine retrouvées dans les cellules sous forme de zymogène inactif. Elles sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires incluant l'apoptose. Les caspases apoptotiques sont séparées en deux catégories. Les caspases régulatrices [2, 8, 9, 10] et les caspases effectrices [3, 6, 7]. En présence de signaux pro-apoptotiques, les caspases régulatrices activent les caspases effectrices par clivage. Les caspases effectrices clivent ensuite différents substrats sur une séquence spécifique [X-Glu-X-Asp]. Le clivage de ces cibles facilite l'apoptose en favorisant la condensation nucléaire, la fragmentation de l'ADN ou encore la destruction de la membrane cytoplasmique (281). De façon complémentaire, les caspases clivent parfois certaines protéines afin de moduler positivement ou négativement leur activité. Les peptides résultant de ces clivages peuvent changer de localisation et acquérir de nouvelles fonctions (282). C'est par exemple le cas de la kinase CHK1. Lorsqu'elle est clivée par la caspase 7, son domaine kinase se relocalise au cytoplasme où il participe au renforcement de l'apoptose (283). Plusieurs autres protéines du DDR sont également ciblées par les caspases dans un contexte d'apoptose; il s'agit entre autres des Claspins, de MDC1 ou encore d'ATM (284-286).

La structure générale des caspases est très conservée. Les caspases sont composées de deux domaines [P10 et P20]. Le site de clivage nécessaire à leur activation se trouve

à l'intersection de ces deux domaines. Les caspases régulatrices possèdent un fragment N-terminal plus développé. Cette zone est nécessaire à leur activation et à leur interaction avec les caspases effectrices (287). L'activation des caspases est fréquemment modulée par des phosphorylations régulatrices (282).

#### **1.8.1.4 Les caspases hors de l'apoptose**

Les caspases ont pendant longtemps été intrinsèquement liées à l'apoptose. Cependant, il a été rapporté à plusieurs reprises qu'elles possèdent des fonctions en dehors de l'apoptose. Les caspases 1, 4, 5, participent par exemple aux processus d'inflammation où elles jouent un rôle dans la production des cytokines pro-inflammatoires [de petites molécules régulatrices]. Par ailleurs, il a été rapporté que les caspases 3 et 8 sont impliquées dans le contrôle de la prolifération et dans la différenciation cellulaire (265, 288). De nombreux autres exemples sont régulièrement rapportés, ce qui laisse penser que ce mécanisme est plus courant qu'initialement pensé.

### **1.8.2 La sénescence cellulaire**

#### **1.8.2.1 La sénescence un processus complexe intrinsèquement relié au DDR**

Lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants ou lorsqu'ils sont persistants, les tentatives de réparation sont abandonnées par les cellules. Afin d'éviter de propager des dommages aux cellules filles, un processus d'arrêt du cycle cellulaire peut être enclenché. Ce processus, appelé sénescence, est caractérisé par un arrêt de prolifération définitif. Les cellules qui entrent dans cet état continuent d'être métaboliquement actives. L'entrée des cellules en sénescence peut avoir diverses causes. En outre, les phénotypes qui accompagnent sa mise en place sont très variables (289). La sénescence répllicative compte parmi celles les mieux caractérisées. Les travaux de Leonard Hayflick ont montré que les cellules ne peuvent pas se diviser indéfiniment dû au raccourcissement des télomères au fil des différentes divisions cellulaires. Cette diminution de la prolifération cellulaire à long terme est due au fait que la télomérase, cette enzyme responsable de l'allongement des télomères, est absente

ou très peu active dans les cellules somatiques (290, 291). En temps normal, les télomères sont recouverts de diverses protéines qui empêchent leur reconnaissance comme bris double brin à l'ADN. C'est par exemple le cas du complexe Shelterin. Lorsque les télomères sont raccourcis au-delà de la limite de Hayflick, ces protéines ne sont plus en mesure de les protéger. Les extrémités libres des télomères sont alors reconnues par des protéines du DDR en tant que bris double brin, ce qui induit un signal de dommage permanent. Les cellules entrent alors en sénescence dite répllicative (292, 293).

Par ailleurs, la sénescence peut être induite par de nombreux autres facteurs. Par exemple elle peut être déclenchée par l'accumulation de dommages à l'ADN accidentels (294). Par ailleurs la sénescence peut être induite via la modulation de l'expression d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur (295). Il a été montré que l'expression anormale de l'oncogène RAS ou la diminution du suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) induit la sénescence. Dans ce cas, les cellules sont exposées en permanence à un signal mitogène, ce qui favorise l'apparition de stress réplcatif et l'activation du DDR (296-299). Les protéines du DDR jouent un rôle clé dans le déclenchement de ce type de sénescence (300). Bien que les cellules sénescents présentent des caractéristiques multiples, elles partagent un certain nombre de propriétés communes qui les caractérisent.

### **1.8.2.2 Les caractéristiques des cellules sénescents**

Les cellules sénescents présentent un phénotype particulier. Celui-ci est cependant très variable d'un type cellulaire à un autre. Les caractéristiques partagées par toutes les cellules sénescents sont l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> et le maintien du métabolisme cellulaire. Celui-ci est cependant très ralenti. Plusieurs changements morphologiques sont observés chez les cellules sénescents. Celles-ci ont tendance à être plus larges, très aplaties et multinucléées. La composition de la membrane cytoplasmique est également modifiée avec une accumulation notable de cavéoline (289, 301).

De plus, le contenu des lysosomes ainsi que la quantité de protéines lysosomales sont fréquemment augmentés. L'expression de la bêta-galactosidase est par exemple augmentée dans les cellules sénescents. Le suivi de son niveau est d'ailleurs fréquemment utilisé comme marqueur de sénescence . En outre, les cellules sénescents présentent fréquemment une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (302). Enfin la mise en place de la sénescence est souvent accompagnée de la formation de foci de dommages à l'ADN persistants (DNA-SCARS) ainsi que de l'apparition de foci d'hétérochromatine (SAHF) (303, 304).

Le patron de sécrétion des cellules sénescents (SASP) est souvent modulé. Cette observation est particulièrement vraie dans les cellules où le DDR est activé de façon persistante. Les SASP regroupent un ensemble de facteurs sécrétés tels que des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance ou encore des protéases. Ces facteurs sont le plus souvent pro-inflammatoires. Ils agissent par des actions paracrines ou autocrines (303). Ainsi, les SASP sont en mesure de moduler l'environnement immédiat des cellules sénescents. La sécrétion des SASP varie au cours du temps et de la progression de l'état de sénescence. Leurs actions peuvent être tout autant bénéfiques que délétères. C'est par exemple le cas des interleukines IL6 ou IL8. Dans un premier temps elles renforcent la sénescence en stimulant l'expression d'autres SASP. Ainsi elles ont un effet suppresseur de tumeur en évitant la prolifération cellulaire. Dans un second temps, leur expression peut favoriser la progression tumorale. En effet, de façon générale le caractère pro-inflammatoire des SASP crée un environnement propice à la transformation tumorale des cellules voisines (305, 306). Cette inflammation chronique dans le tissu avoisinant favorise aussi le vieillissement tissulaire et supporte l'apparition de pathologies dégénératives (307).

### **1.8.2.3 La signalisation de la sénescence**

Le déclenchement de la sénescence cellulaire est hautement régulé. Deux voies sont principalement impliquées dans son initiation. L'une est médiée par p16 et l'autre par p53. Ces deux voies peuvent induire la sénescence de façon indépendante. Elles

agissent toutes deux par l'intermédiaire d'inhibiteurs des complexes cycline-CDKs (CKI) et du suppresseur de tumeur RB (289).

La protéine p16 est un inhibiteur des cycline-CDKs. Cette protéine joue un rôle important dans l'installation et dans le maintien de la sénescence. En présence de stress cellulaire, l'expression de p16 est augmentée. Elle inhibe alors le complexe cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6. Dans ce cas, la protéine RB reste sous forme hypophosphorylée et le cycle cellulaire est bloqué en G<sub>1</sub> (308, 309).

Le suppresseur de tumeur p53 permet également l'installation de la sénescence. Comme nous l'avons vu plus tôt, lorsque les cellules sont soumises à un stress, p53 est stabilisé par l'intermédiaire de l'activation des kinases du DDR. p53 induit ensuite la transcription de différents gènes incluant la CKI p21. p21 inhibe les complexes cycline D-CDK4, cycline D-CDK6 et cycline E-CDK2. Ainsi la protéine RB reste sous forme hypophosphorylée et le point de contrôle G<sub>1</sub>/S est activé (172, 173).

### **1.8.3 Les autres voies de mort cellulaire liées au DDR**

L'apoptose est la voie principalement utilisée pour éliminer les cellules en réponse à l'activation du DDR. Il a cependant été montré que d'autres voies de mort cellulaire programmée sont parfois utilisées (310). L'activation du DDR peut par exemple induire l'autophagie. Cette voie catabolique permet d'éliminer des protéines et des organelles cellulaires par protéolyse lysosomale. Classiquement, l'autophagie est connue pour favoriser la survie cellulaire en présence de dommages à l'ADN. Cependant il a été montré que dans certains cas où un stress cellulaire intense est présent, elle contribue à la mort cellulaire. Pour se faire, l'autophagie induit la dégradation d'un grand nombre de protéines cellulaires ou l'élimination d'organelles essentielles telles que les mitochondries (311, 312). Dans un contexte de dommages à l'ADN, l'autophagie est en partie médiée par des protéines régulatrices du DDR telles que p53 et ATM (310, 313).

En outre, l'activation du DDR peut conduire à l'activation de la nécrose programmée. La nécrose est caractérisée par une perte des membranes nucléaire et cytoplasmique ainsi que par une perte de l'intégrité cellulaire. La nécrose programmée est une forme de



nécrose contrôlée. Elle est en grande partie régulée par la protéine du DDR PARP1 (310, 314).

## **1.9 DDR et maladies**

### **1.9.1 Le dysfonctionnement du DDR est à l'origine de plusieurs pathologies**

La régulation des voies de réponse à l'ADN est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet chez les personnes où les voies du DDR sont dérégulées, un large spectre de pathologies apparaît. Ces maladies sont la plupart du temps liées à l'accumulation de dommages à l'ADN et à l'installation d'instabilité génomique et d'aberrations chromosomiques (5).

Comme nous l'avons vu plus tôt, de nombreux éléments peuvent induire l'apparition de dommages à l'ADN. L'hyper-prolifération cellulaire qui résulte de la présence d'oncogène peut favoriser l'apparition de dommages à l'ADN. C'est par exemple le cas de la cycline E; lorsque celle-ci est anormalement élevée, elle induit une augmentation de prolifération cellulaire et l'apparition de dommages à l'ADN (44). En outre, une grande majorité d'agents carcinogènes induisent également des dommages à l'ADN. Dans le cas où les voies du DDR ne sont pas en mesure de prendre en charge ces dommages, ceux-ci s'accumulent et ouvrent la voie à l'installation de pathologies telles que le cancer (3). Différentes mutations des protéines du DDR conduisent à une baisse des capacités de réponse cellulaire face aux dommages (5). La mutation des gènes BRCA1 et BRCA2 impliqués dans les voies de réparation par recombinaison homologue conduit souvent à l'apparition de cancer du sein ou des ovaires (315). Des mutations des kinases ATM et CHK2 sont également associées à ces deux types de cancer (316, 317). Les mutations des protéines de réparation du NHEJ sont quant à elles fortement associées avec l'apparition de tumeurs hématologiques. En effet, les protéines du NHEJ sont impliquées dans le développement des lymphocytes dans un contexte normal (318). Le suppresseur de tumeur p53 est également muté dans de nombreux cancers sporadiques. Lorsqu'il est déficient, les cellules peuvent plus facilement contourner l'entrée en apoptose ou en

sénescence (319). Deux hypothèses sont avancées pour expliquer les mutations fréquentes des protéines du DDR dans les tumeurs sporadiques. La première soutient le fait que les mutations acquises des protéines du DDR prédisposent à la transformation tumorale. La seconde soutient que les cellules précancéreuses commencent à réprimer différentes protéines du DDR notamment via des modifications épigénétiques. La seconde hypothèse est soutenue par le fait que les cellules au stade précancéreux possèdent encore la plupart du temps des voies du DDR fonctionnelles (38, 320, 321).

La déficience du DDR affecte particulièrement les cellules nerveuses. En effet, l'accumulation de dommages non réparés rend ces cellules métaboliquement non fonctionnelles ou les conduit à l'apoptose. Les neurones ne se divisant pas, ceux éliminés ne sont pas remplacés. De plus, ils n'ont pas accès à la recombinaison homologue pour réparer leur bris double brin à l'ADN puisqu'ils ne se divisent pas. La réparation de ces dommages repose alors uniquement sur le mécanisme NHEJ qui est susceptible d'induire des erreurs (322, 323). Ainsi un lien a été mis de l'avant entre la présence de dommages à l'ADN et des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Huntington (324, 325).

Le dysfonctionnement des voies de réponse aux dommages à l'ADN est également à l'origine de stérilités et de problèmes au niveau du système immunitaire. Ces différents effets sont dus à l'implication normale des protéines du DDR dans ces processus (5).

Les mutations des protéines de signalisation du DDR sont souvent à l'origine de problèmes multiples. Par exemple, les personnes qui ont une mutation d'ATM sont atteintes de la maladie ataxia telangiectasia. Ces patients présentent à la fois une augmentation du risque de cancer, des problèmes neurodégénératifs, des problèmes immunitaires, des problèmes de stérilité et une radiosensibilité accrue (325). Il arrive également que les protéines de réparation soient mutées. Dans ce cas, les dommages à l'ADN s'accumulent au fil du temps. C'est par exemple le cas dans le syndrome de Cockayne ou dans la maladie xeroderma pigmentosum. Dans ces deux exemples, les protéines de l'une ou l'autre des voies de réparation NER sont mutées. Ces patients

présentent à la fois des problèmes neurologiques et une hypersensibilité aux rayons UV (326).

### **1.9.2 Le DDR comme cible thérapeutique**

La grande majorité des thérapies anticancéreuses actuellement utilisées telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie reposent sur l'induction de dommages à l'ADN. Étant donné que les cellules cancéreuses se divisent plus rapidement que les cellules normales, elles sont davantage affectées par les dommages induits et elles sont éliminées (327). Cependant, de nombreuses cellules cancéreuses ont la capacité d'utiliser les voies du DDR afin de réparer ces dommages et ainsi favoriser leur survie (321, 328, 329). Les voies du DDR sont ainsi détournées de leur activité initiale qui est de prévenir le développement tumoral. Afin de contourner ce problème, il est de plus en plus courant de combiner les traitements anticancéreux classiques avec des inhibiteurs du DDR. Plusieurs essais cliniques sont en cours avec des inhibiteurs de ATR, ATM, CHK1, CHK2, DNA-PK ou encore WEE1. D'autre part, il arrive que des cellules cancéreuses perdent certaines voies de réparation de dommages à l'ADN; on peut alors tirer avantage de cette déficience. Un exemple très actuel est l'utilisation d'inhibiteurs de PARP. Comme nous l'avons vu plus tôt, PARP1 est impliquée dans la réparation des bris simple brin. Lorsque PARP1 est inhibée, le nombre de bris simple brin augmente et ceux-ci peuvent se transformer en bris double brin. Ces bris s'ils sont pris en charge ne poseront pas de problème majeur. En revanche dans les cellules qui ne possèdent pas de mécanismes de réparation appropriés, ils seront hautement toxiques. De façon tout à fait intéressante, plusieurs types de cellules cancéreuses ne possèdent plus de voies de réparation des bris double brin par recombinaison homologue. Ces cellules seront donc plus sensibles aux inhibiteurs de PARP et ont plus de chance d'être éliminées que les cellules normales (330, 331). Ainsi le DDR se trouve ni plus ni moins au carrefour entre pathogenèse et thérapie cellulaire. Il peut tout aussi bien contribuer à la prévention de maladies graves lorsqu'ils fonctionnent normalement qu'à leur installation lorsqu'il est dérégulé.



## Chapitre 2 – Les protéines de liaison à l'ARN

Les ARN sont des acteurs incontournables de la cascade d'expression des gènes. Leur régulation est donc primordiale et doit être finement régulée (332). Les protéines de liaison à l'ARN (*RBP : RNA binding protein*) sont très répandues, elles représentent environ 7,5 % des protéines cellulaires totales. Elles participent à la grande majorité des étapes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, incluant notamment leur localisation. Cela en fait un élément central de la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes (333, 334).

### 2.1 La structure des RBP et leur interaction avec les ARN

Les protéines de liaison à l'ARN forment des complexes ribonucléoprotéiques en liant des ARN via des domaines très conservés appelés domaines de liaison à l'ARN (335). On retrouve couramment chez les eucaryotes quatre sortes de domaines de liaison à l'ARN. Il s'agit des domaines de type RRM (*RNA-recognition motif*), KH (*K homology domain*), dsRBD (*double-stranded RNA-binding domain*), et en doigt de zinc (*zinc finger*) (336-339). Chacun de ces domaines a une spécificité de liaison à l'ARN qui lui est propre. Les protéines de liaison à l'ARN peuvent posséder un ou plusieurs de ces domaines simultanément. L'association de différentes combinaisons permet d'augmenter la spécificité de liaison. De plus, les RBP sont des protéines extrêmement modulaires et elles possèdent fréquemment plusieurs domaines fonctionnels en plus des domaines de liaison à l'ARN. Cela contribue à leur multidisciplinarité. Ces différents domaines permettent aux RBP d'interagir avec d'autres protéines (335).

L'interaction entre les protéines de liaison à l'ARN et leurs ARN cibles est centrale. Cette interaction peut avoir lieu avec plusieurs types d'ARN incluant les ARN messagers et les ARN non codants (340). Les ARN peuvent être liés soit sous forme simple brin soit sous forme double brin. L'interaction avec les ARN est dépendante d'éléments régulateurs présents sur les ARN et du type de domaine de liaison porté par les RBP. Cette interaction cible le plus souvent la structure secondaire des ARN (341, 342). Il est

cependant rapporté dans la littérature plusieurs cas où la structure primaire est également impliquée (335).

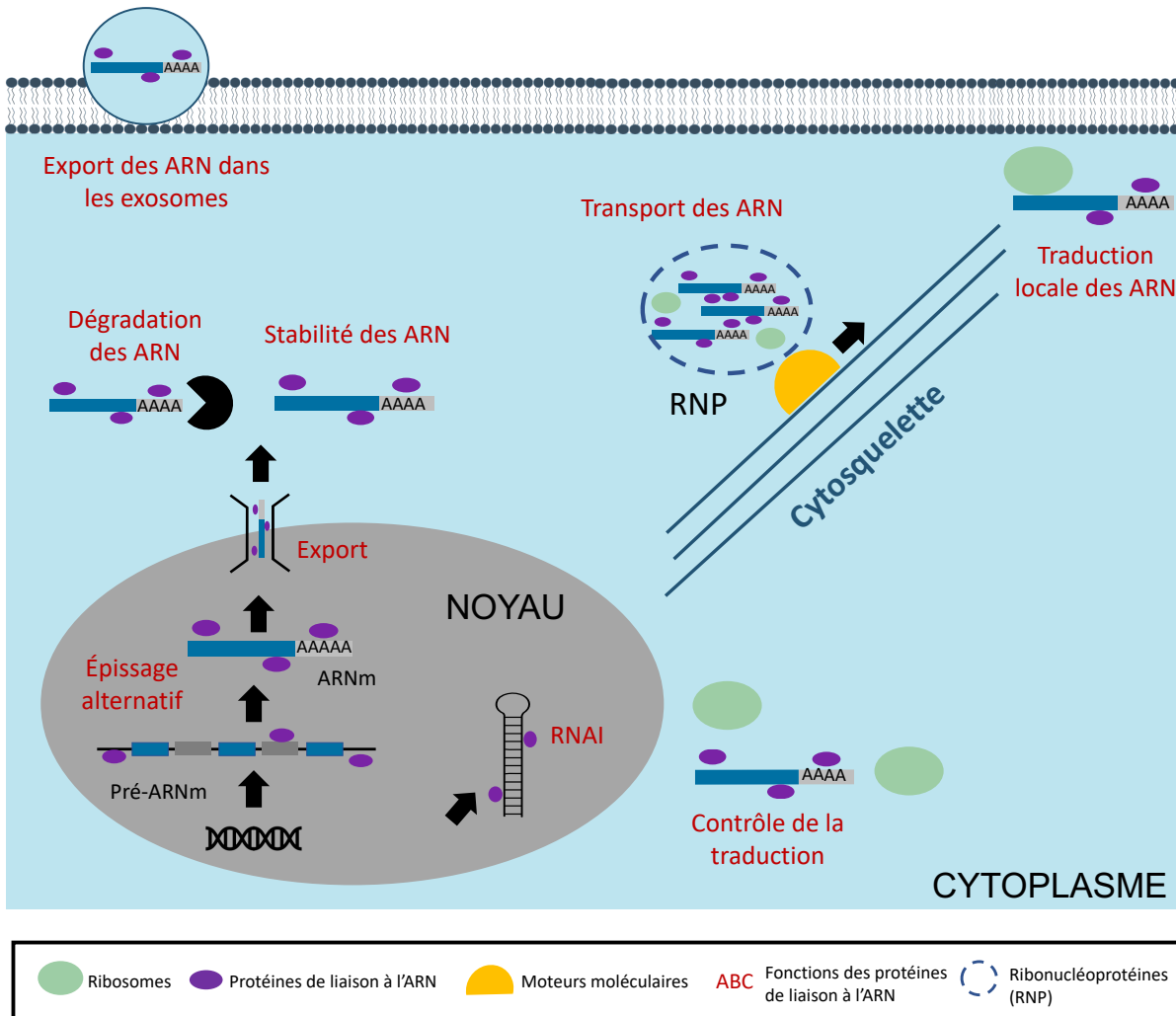


Figure 6.

**Figure 6: Les Protéines de liaison à l'ARN ont de multiples fonctions.**

Représentation schématique des différentes fonctions des protéines de liaison à l'ARN (RBP). Les RBP lient les ARNm dès leur transcription dans le noyau. Elles participent ensuite aux différentes étapes du métabolisme des ARNm. Ces étapes sont ici représentées en rouge. Les protéines de liaison à l'ARN accompagnent certains transcrits jusqu'à leur traduction. Elles s'associent fréquemment sous forme de complexes ribonucléoprotéiques afin de médier le transport des ARN. Enfin, elles sont parfois impliquées dans l'export extracellulaire des ARN via les exosomes. En plus de contrôler le devenir des ARNm, les RBP participent aussi à la régulation des ARN non codants.

## 2.2 Les fonctions primaires des RBP

Les RBP sont essentielles au bon déroulement de plusieurs processus cellulaires. Les protéines de liaison à l'ARN participent à la régulation post-transcriptionnelle des ARN qu'elles lient (Figure 6). Une des fonctions primaires des RBP est le contrôle spatio-temporel de l'expression des gènes (343). En effet en s'associant avec les ARN, les RBP contrôlent leur devenir et notamment leur localisation cellulaire (341). Cette localisation dépend souvent de mécanismes de transport actif reposant sur l'association avec le cytosquelette (343). L'association des RBP avec des moteurs moléculaires tels que les dynéines et les kinésines leur permet de se déplacer le long des microtubules (344).

La localisation des ARNm de façon active par les RBP est une opportunité importante d'économie d'énergie pour les cellules. En effet au lieu de transporter des protéines déjà synthétisées dans un lieu cellulaire spécifique, transporter des ARNm couplés avec une RBP nécessite moins d'énergie. Les RBP sont fréquemment associées à des répresseurs de traduction, ainsi les ARNm liés ne sont exprimés qu'à un moment donné et dans un lieu précis (345). Cela contribue directement à la régulation de l'expression des ARN liés. De plus, ce mécanisme permet dans certains cas d'engendrer localement une augmentation rapide d'une protéine en particulier (346). Il est fréquent que les RBP transportent simultanément des ARNm codants pour des protéines impliquées dans une même voie cellulaire. Leur traduction concertée permet dans ce cas d'activer ou de renforcer une voie cellulaire spécifique à la suite d'un signal activateur (347). Il est important de remarquer que les RBP peuvent également participer à la localisation des ARN de façon passive. En effet, dans certains cas, les RBP sont disposées stratégiquement à un endroit donné et capturent des ARN qui diffusent librement dans la cellule (348).

Très souvent, les protéines de liaison à l'ARN sont associées à certains ARN, de leur transcription jusqu'à leur traduction. Ainsi les RBP se retrouvent impliquées dans de nombreuses étapes du métabolisme des ARN (341). Parmi elles, on retrouve l'épissage alternatif, la polyadénylation, l'export du noyau, le transport cytoplasmique ou même l'export extracellulaire des ARNm (349, 350).

Les RBP sont par ailleurs impliquées dans le maintien de la stabilité des ARN et dans leur dégradation (351). D'une part, les RBP protègent les ARN auxquels elles sont liées d'une dégradation aléatoire par des nucléases; d'autre part, elles peuvent favoriser la dégradation spécifique de certains ARN par une association avec des protéines des voies de dégradation (352).

En plus de moduler l'expression des gènes par un contrôle direct du devenir des ARNm qu'elles lient, les RBP peuvent réguler différents miRNA qui à leur tour affectent l'expression de divers gènes (353). Grâce à ces différentes fonctions, les RBP se retrouvent impliquées dans plusieurs voies cellulaires majeures.

## **2.3 L'importance cellulaire des RBP**

### **2.3.1 Les RBP, des protéines omniprésentes**

Les RBP sont impliquées dans de très nombreux processus cellulaires au travers de la régulation post-transcriptionnelle des ARN qu'elles lient (341). Les protéines de liaison à l'ARN sont d'autant plus remarquables que leur implication dans les voies cellulaires dépend autant de leur fonction en tant que protéine que des ARN qu'elles lient. Les RBP sont largement impliquées dans le développement embryonnaire. En effet, elles permettent de réguler spatio-temporellement l'expression de certains gènes clés du développement. Elles contribuent par exemple à la mise en place de l'axe antéro-postérieur chez la drosophile (346, 354). Les RBP sont également indispensables au transport des ARNm dans les cellules nerveuses. Ce transport contribue directement à la plasticité synaptique (355, 356). Les RBP sont aussi impliquées dans la différenciation et la motilité cellulaire (341). En outre, les RBP participent à la réponse au stress cellulaire via la formation de granule de stress (341).

### **2.3.2 Rôle des RBP dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN**

Plusieurs études rapportent une association entre les protéines de liaison à l'ARN et les voies de réponses aux dommages à l'ADN (357). Des études à large échelle ont montré que plusieurs RBP étaient directement régulées par les kinases centrales du DDR en



présence de dommages à l'ADN (73, 94). C'est par exemple le cas des protéines de liaison à l'ARN HuR et PABC1 qui sont respectivement phosphorylées par CHK2 et ATM (358, 359). De plus, il a été montré que l'expression de différentes RBP était augmentée en présence de dommages à l'ADN ce qui influe le devenir des ARN qu'elles lient (360). Ainsi la stabilité et le niveau d'expression de plusieurs cibles des RBP sont modulés en présence de dommages à l'ADN. C'est par exemple le cas de l'ARNm de p21. En l'absence de dommages à l'ADN, l'ARNm de p21 est lié par les protéines de liaison à l'ARN AUF1 et HuR. L'association avec HuR favorise l'expression de p21 alors que l'association avec AUF1 favorise sa répression. En présence de dommages à l'ADN, l'association entre p21 et HuR augmente, induisant une augmentation de l'expression de p21 et in fine un arrêt du cycle cellulaire (361).

Il a été rapporté que d'autres RBP s'associent avec des ARNm en présence de dommages à l'ADN afin de favoriser leur traduction. C'est par exemple le cas de la protéine de liaison à l'ARN RPL26 qui se lie à l'ARNm de p53 en présence de dommages à l'ADN. Cette interaction favorise l'expression de p53 en augmentant l'interaction de son ARNm avec les ribosomes (362). L'expression des protéines de la famille GADD (*Growth arrest DNA damage protein*) ou celle de la cycline D en présence de dommages à l'ADN est également régulée par un mécanisme similaire impliquant des RBP (359, 363).

En outre, il a été montré que les RBP sont parfois directement recrutées aux sites de dommages à l'ADN. PARP1 est une protéine très impliquée dans les premières étapes du DDR. PARP1 contrôle le recrutement des protéines de liaison à l'ARN FUS et NONO à proximité des sites de dommages à l'ADN (364-366). La RBP NONO joue parallèlement un rôle dans l'inactivation de la voie ATR-CHK1 à la fin de la réponse aux dommages à l'ADN (367).

Il a par ailleurs été rapporté que plusieurs RBP étaient modulées à la suite du déclenchement de l'apoptose. Dans ce cas, elles participent directement à l'équilibre entre protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Cette action a lieu soit par une régulation directe des ARNm liés, soit par une modulation de miRNA ou de lncRNA (*Long*

*non-coding RNAs*) (368, 369). Les ARNm des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 sont par exemple déstabilisés en l'absence de la RBP HuR; cela favorise l'entrée des cellules en apoptose (370). En complément, il a été rapporté que certaines RBP régulent l'expression et l'activation des caspases exécutrices (371). Ainsi il devient apparent que les protéines de liaison à l'ARN sont impliquées à plusieurs niveaux du DDR. Elles permettent entre autres de lier le métabolisme des ARN aux voies de réponse aux dommages à l'ADN.

### **2.3.3 Rôle des RBP dans le contrôle de la prolifération cellulaire**

Les RBP sont également impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Ainsi grâce à leur fonction de régulateur de l'expression des gènes, les RBP peuvent avoir un effet qui favorise ou réprime la prolifération cellulaire. Ce mécanisme est souvent dépendant des fonctions des ARNm liés. La RBP HuR est par exemple en mesure d'influencer positivement la prolifération cellulaire en stabilisant les ARNm codant pour plusieurs cyclines (372). Dans d'autres cas, les RBP modulent la prolifération via un contrôle du métabolisme des ARNm. L'ARNm de NUMB (*Protein numb homolog*) peut par exemple être lié de façon compétitive par deux RBP différentes. Cette liaison peut induire la formation de deux isoformes différentes par épissage alternatif. Lorsque cet ARNm est associé à QKI (*Protein quaking*), le transcrit obtenu réprime la prolifération cellulaire (373). Au contraire lorsque l'ARNm de NUMB est lié par SRSF1, le produit d'épissage obtenu favorise la prolifération cellulaire (374). Il arrive également que les RBP contrôlent la prolifération cellulaire par l'intermédiaire d'ARN non codant. Les RBP de la famille LIN28 contrôlent par exemple les miRNA de la famille let-7 (375). Ces miRNA sont impliqués dans la régulation de plusieurs oncogènes tels que KRAS (*GTPase KRas*), HMGA2 (*High-mobility group AT-hook 2*) ou MYC (*Myc proto-oncogene protein*) (376). Comme nous venons de le voir, la dérégulation des RBP peut impacter la prolifération cellulaire, à terme cela peut soutenir l'apparition à diverses pathologies.

## **2.4 RBP et pathologies cellulaires**

Les RBP au travers de leurs différentes fonctions sont associées à de nombreuses pathologies. En effet, lorsque les RBP sont dérégulées l'impact sur le patron

d'expression des protéines cellulaires est immédiat. Par exemple lorsqu'une RBP est dégradée, des ARNm normalement liés se retrouvent libres dans la cellule; ils peuvent alors être traduits à tort, ou au contraire, être dégradés de façon précoce (377). Il apparaît clairement que lorsque les RBP sont dérégulées, la localisation des ARN ainsi que les différentes étapes du métabolisme des ARN peuvent être altérées. En retour de nombreuses voies cellulaires sont perturbées menant à diverses maladies.

Les RBP favorisent par exemple le développement tumoral. Les RBP sont fréquemment surexprimées ou sous exprimées dans les cancers. Elles agissent sur le développement tumoral de plusieurs façons. Les RBP favorisent la prolifération cellulaire via la stabilisation d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur. De plus, elles permettent parfois aux cellules d'échapper à l'apoptose en influant sur la stabilité de régulateurs. Enfin, il est rapporté qu'elles peuvent influencer l'angiogenèse et l'invasion cellulaire par le contrôle post-transcriptionnel de divers ARN (378). En outre, il a été rapporté que les RBP sont nécessaires à la stabilisation des hybrides DNA/RNA (R-Loop). Ainsi, lorsque les RBP sont dérégulées, une instabilité génomique liée aux R-Loop se développe et peut contribuer à terme à promouvoir la transformation tumorale (379).

Les protéines de liaison à l'ARN sont également fréquemment associées avec des pathologies neurodégénératives. En effet, elles ont plusieurs fonctions dans les neurones où leur dérégulation perturbe le métabolisme des ARN à de nombreux niveaux. Plusieurs mécanismes peuvent altérer les fonctions des RBP dans les cellules nerveuses. Dans certains cas, le niveau d'expression des RBP est diminué à la suite de mutations ou de réactions auto-immunes. Dans d'autres cas, les RBP forment des agrégats ce qui perturbe leur localisation et leur fonction. Il est intéressant de remarquer qu'un grand nombre de RBP possèdent des domaines *prion-like*. Il a été rapporté que ces domaines extrêmement complexes sont souvent impliqués dans l'agrégation anormale des RBP (380). Enfin, il arrive que des RBP lient des transcrits non conventionnels qui comportent de nombreuses séquences répétées. L'association des RBP avec ces transcrits séquestre les RBP et les empêche de lier leurs transcrits normaux par compétition (381). Toutes ces perturbations de l'homéostasie des RBP sont à l'origine de diverses

pathologies telles que des démences, des dystrophies musculaires, des ataxies, des déficiences intellectuelles, ou encore des épilepsies (381, 382).

## **Chapitre 3 – Staufen, une famille de protéines multifonctionnelles**

### **3.1 Les protéines de la famille Staufen**

Les protéines de la famille Staufen sont des protéines de liaison à l'ARN double brin. Ces protéines sont impliquées dans de très nombreux processus cellulaires. Leurs fonctions sont très souvent dépendantes de la régulation spatio-temporelle de l'expression des ARNm qu'elles lient (383).

Staufen a tout d'abord été caractérisée chez la drosophile où elle joue un rôle crucial pendant le développement embryonnaire. En effet, Staufen participe à la localisation des ARNm Oskar et Bicoid; tous deux sont indispensables pour la mise en place de la polarité antéro-postérieure de l'embryon (346, 384). Cette localisation est dépendante du cytosquelette et des moteurs moléculaires (385). Une déplétion de Staufen chez les embryons de drosophile induit des malformations sévères (386). En complément, il a été rapporté très tôt que Staufen était impliquée dans le développement cérébral. Elle participe à la localisation de l'ARNm prospero dans les cellules souches neurales chez la drosophile. Cette localisation est nécessaire à la division asymétrique de ces cellules (387).

Chez les humains, deux paralogues de Staufen sont retrouvés, STAU1 (*Staufen homologue 1*) et STAU2 (*Staufen homologue 2*). Ces deux protéines ont été en grande partie caractérisées par notre laboratoire. Leurs gènes se trouvent respectivement sur le chromosome 20 et sur le chromosome 8 (388, 389). Les deux paralogues partagent environ 50 % d'identité de séquences. Cette similarité est particulièrement marquée au niveau de leurs domaines de liaison à l'ARN (388). Les protéines STAU1 et STAU2 ont toutes deux les mêmes fonctions moléculaires, à savoir la liaison d'ARN et la formation de complexes ribonucléoprotéiques pour contrôler, entre autres, l'épissage alternatif, la stabilité et/ou la dégradation des ARN liés. Elles ont cependant des fonctions biologiques différentes. Elles ne participent pas aux mêmes

voies de régulation et elles lient chacune des ARN spécifiques. Chez les mammifères elles ont été très caractérisées pour leur rôle dans la plasticité synaptique et la communication neuronale (383). STAU1 et STAU2 sont des protéines multifonctionnelles impliquées dans de nombreuses voies. Il a par exemple été rapporté que STAU1 est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (390). Les fonctions détaillées de STAU2 seront présentées plus loin.

## **3.2 La protéine Staufen 2**

### **3.2.1 Caractéristiques générales de Staufen 2**

Le gène codant pour la protéine STAU2 se trouve sur le chromosome 8 dans la région 8q13-q21.1 (388). Chez les humains quatre isoformes de STAU2 sont retrouvées, STAU2 52 KDa, 56 KDa, 59 KDa, et 62 KDa (Figure 7). L'isoforme la plus exprimée est généralement l'isoforme 52 KDa (388). Ces différentes isoformes sont obtenues par épissage alternatif de l'ARN messenger. Les isoformes sont tronquées soit à l'extrémité C-terminale, soit à l'extrémité N-terminale (391). Bien que la protéine STAU2 soit ubiquitaire, on la retrouve majoritairement exprimée dans le cerveau, dans les muscles squelettiques et dans le cœur (391). L'expression de STAU2 est régulée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription E2F1 (392).

STAU2 possède quatre domaines semblables à la séquence consensus des domaines de liaison à l'ARN de type dsRBD (RBD1 à RBD4) (388, 393). Ces domaines ont une longueur moyenne de 90 acides aminés et lient l'ARN sous forme double brin. Les domaines sont très conservés entre les différentes isoformes ainsi qu'entre les différentes espèces possédant des protéines de la famille Staufen (388). Il a pendant longtemps été soutenu que seuls les domaines RBD3 et RBD4 liaient effectivement les ARNm chez les eucaryotes supérieurs (393). Cependant, des données récentes semblent montrer chez la souris que les domaines RBD1 et RBD2 lient les ARNm avec une affinité semblable à celle des domaines RBD3 et RBD4 (394). La fonction des domaines RBD1 et RBD2 reste à ce jour mal caractérisée. En plus de lier les ARNm, les domaines RBD participent aux interactions protéine-protéine de STAU2. STAU2 possède également un

domaine SSM (*Staufen swapping motif*) permettant sa dimérisation (homo ou hétéro) et un domaine d'association avec la tubuline (TBD : *tubulin binding domain*) (393).

Bien que STAU2 soit majoritairement localisée dans le cytoplasme des cellules, elle est également transportée vers le noyau via un mécanisme régulé (395). La protéine STAU2 comporte un signal d'adressage nucléaire (NLS: *nuclear localization signal*) entre les domaines RBD3 et RBD4 et différents signaux d'export nucléaire (NES : *nuclear export signal*) (396). Selon les isoformes, l'export de STAU2 repose sur différents systèmes de transport nucléocytoplasmique. En effet, l'isoforme 62 est exportée selon un mécanisme dépendant de l'exportine 5 et d'un signal NES présent dans le domaine RBD3. L'isoforme 59 possède quant à elle un NES supplémentaire en N-terminal obtenu par épissage alternatif. Son export est médié à la fois par l'exportine 5 et par l'exportine 1 (CRM1) (396, 397).

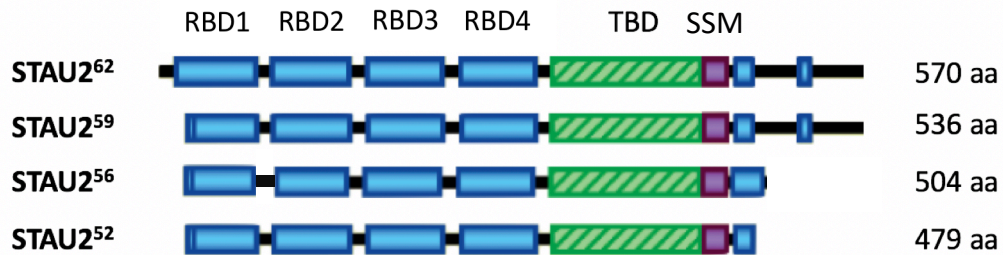


Figure 7. (A)

**Figure 7 : Représentation schématique des différentes isoformes de Staufen2. (A)**

La protéine de liaison à l'ARN Staufen 2 possède quatre isoformes obtenues par épissage alternatif. Chacune de ces isoformes comporte trois ou quatre domaines de liaison à l'ARN double brin (RBD). Staufen 2 comporte également un domaine d'association à la tubuline (TBD) et un domaine de dimérisation (SSM).

STAU2 participe à la formation des complexes ribonucléoprotéiques en liant des structures secondaires double brin d'ARNm (398). Par homologie avec STAU1, il a été déterminé que ces structures secondaires sont soit des repliements intramoléculaires des ARNm par complémentarité de séquence, soit une association entre un ARNm et un long ARN non codant via une séquence Alu (394, 399). La reconnaissance des ARNm

par STAU2 dépend majoritairement de leur structure secondaire. Ainsi aucune séquence primaire consensus sur les ARNm n'a été identifiée (383). Une étude par micropuces géniques des ARNm liés par STAU2 a montré qu'environ 11 % des ARN totaux des cellules HEK293 sont liés à STAU2. Ces ARNm codent pour des protéines impliquées dans des processus liés au transport intracellulaire, au métabolisme des ARNm, à l'épissage ou encore au catabolisme. Certains ARNm ne sont liés que par certaines isoformes de STAU2 (400). Une étude similaire dans des cellules neuronales de rat a donné des résultats sensiblement identiques (401). Il a été rapporté à plusieurs reprises que STAU2 est essentielle pour la localisation et l'expression de plusieurs ARNm importants pour le bon fonctionnement cellulaire (402-405).

En plus de participer à la formation de complexes ribonucléoprotéiques, STAU2 interagit avec différentes protéines. Ainsi, STAU2 forme des complexes avec les hétérodimères de tubuline  $\alpha/\beta$  du cytosquelette via son domaine d'interaction TBD. Il a aussi été montré que STAU2 interagit avec différentes protéines impliquées dans l'export des ARNm telles que la protéine TAP (*Nuclear RNA export factor 1*) ou encore la nucléoporine p62. STAU2 interagit aussi avec la protéine chaperonne HSC70, la protéine de jonction exon-exon Y14-mago, et différentes sous-unités ribosomales. Cette interaction facilite la traduction des ARNm auxquels STAU2 est liée (398, 406). Il a été rapporté que STAU2 interagissait avec la protéine en doigt de zinc ZFR (*Zinc finger RNA-binding protein*). Cette interaction semble être nécessaire pour le trafic nucléocytoplasmique de STAU2 62 KDa (407). Il a plus récemment été montré que STAU2 est hyperphosphorylée pendant la mitose. Il semble que la kinase CDK1 participe à ce mécanisme. Le rôle de cette hyperphosphorylation n'a pas pu être clairement identifié, mais elle ne semble pas réguler les fonctions cellulaires connues de STAU2 (408). Bien que le mécanisme exact ne soit pas clair à ce jour, il semble que tout comme STAU1, STAU2 soit en mesure de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser via son domaine SSM (399, 409). Ces différentes caractéristiques confèrent plusieurs fonctions moléculaires à STAU2.



### 3.2.2 Fonctions moléculaires et importance physiologique de Staufen 2

STAU2 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires via la régulation post-transcriptionnelle des ARNm qu'elle lie. STAU2 participe à la régulation de l'expression génétique à différents niveaux (383). Dans les neurones, STAU2 se trouve non seulement dans le corps cellulaire, mais aussi dans les dendrites, où elle joue un rôle dans la localisation des ARNm (391, 410). Pour cela, les complexes ribonucléoprotéiques circulent le long des microtubules via les moteurs moléculaires kinésines et dynéines (411). Ce mécanisme est régulé en partie par la voie des MAP kinases (412, 413). Cela permet une traduction locale des ARNm transportés. Lors du transport, STAU2 interagit également avec plusieurs répresseurs de traduction évitant l'expression précoce de ces gènes (414, 415). STAU2 est aussi présente dans la partie post-synaptique de la jonction neuromusculaire où elle contribue à la maturité et à la plasticité de celle-ci (416). Il a également été rapporté que STAU2 est aussi retrouvée au niveau des axones, sans que cette observation ne soit plus investiguée (417).

Par ailleurs, il a été montré que STAU2 participe à la dégradation des ARNm qu'elle lie. Cette dégradation est dépendante d'une interaction protéine-protéine avec la protéine UPF1 (418, 419). STAU2 est aussi impliquée dans l'épissage alternatif (420). Par ailleurs, dans le cas où la cellule est soumise à un stress pendant la traduction, le polysome se sépare et STAU2 est recrutée dans des granules de stress. Cela permet de protéger les ARNm qui lui sont liés. Ce mécanisme ne concerne que les ARN polyadénylés (421). D'autres éléments tels que la protéine PABP (*Poly (A) binding protein*) ou les petites sous-unités ribosomales sont également retrouvées dans les granules de stress. Ce mécanisme participe ainsi à une redistribution des ARNm. De façon intéressante, STAU2 et son paralogue STAU1 ne sont pas recrutés dans les mêmes granules (421).

Même si certains mécanismes restent mal compris, il a été montré à plusieurs reprises que la dérégulation de STAU2 entraîne des dysfonctionnements importants notamment au niveau de la prolifération et de la différenciation cellulaire. STAU2 est nécessaire pour la morphogenèse des épines dendritiques. En effet, une déplétion de STAU2 induit

différents problèmes morphologiques et biochimiques tels que la diminution du nombre de synapses et du nombre d'épines dendritiques. Ces effets sont dus à la perturbation du transport des ARNm (422). De plus, il a été rapporté que STAU2 est nécessaire pour la régulation de la dépression des neurones hippocampiques à long terme (423). La déplétion de STAU2 dans les cellules nerveuses est à l'origine d'une diminution de la plasticité synaptique. Cela conduit chez le rat et la souris à plusieurs problèmes cognitifs notamment un déficit de mémoire spatiale et des troubles de l'apprentissage (424, 425).

Chez le xénope commun, STAU2 est nécessaire pour la formation des organes antérieurs (426). Chez le poisson zébré, STAU2 est indispensable pour la survie et la migration des cellules primaires (427). Chez le poulet, une déplétion de STAU2 entraîne la formation d'yeux de petite taille à cause d'une diminution de la prolifération cellulaire (428, 429). De façon surprenante, chez le rat, STAU2 régule le devenir des cellules souches neuroblastiques, en contrôlant la balance entre la prolifération et la différenciation de ces cellules. Une diminution du niveau d'expression de STAU2 entraîne la différenciation des cellules neuronales souches alors que la surexpression de STAU2 favorise la prolifération de celles-ci (430, 431). Il a également été montré que STAU2 est nécessaire pour l'intégrité du fuseau de microtubules pendant la méiose dans les ovocytes de souris. Une déplétion de STAU2 perturbe la formation du fuseau mitotique et empêche l'alignement correct des chromosomes sur le plan équatorial. Ainsi la déplétion de STAU2 mène à une ségrégation défectueuse des chromosomes et au blocage de la progression de la méiose (432). À la lumière de ces découvertes, il paraît évident que STAU2 joue un rôle primordial dans de multiples processus cellulaires. Cela en fait un excellent candidat qui pourrait être impliqué dans d'autres voies de régulation complexes.

### **3.2.3 Implication de STAU2 dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN**

Plusieurs découvertes récentes suggèrent que STAU2 pourrait participer à la réponse aux dommages à l'ADN. Une étude par micropuces génétiques a permis d'identifier les ARNm liés à STAU2 dans des cellules HEK293T. Plusieurs de ces ARNm codent pour des protéines impliquées dans des voies de régulation cellulaire. Parmi les ARN identifiés

se trouvent 49 ARNm codants pour des protéines impliquées dans le DDR ainsi que 150 ARNm codants pour des protéines liées aux voies de mort cellulaire (400).

De plus, il a récemment été rapporté par notre laboratoire que l'expression de STAU2 diminue en réponse à l'induction de dommages à l'ADN (Figure 8). La diminution n'apparaît qu'en réponse à l'induction de bris simple brin. La diminution du niveau de STAU2 a d'abord lieu au niveau transcriptionnel et est médiée par le facteur de transcription E2F1 via la voie de la kinase ATR (392).

À cette même occasion, il a été découvert que l'inhibition des kinases centrales du DDR, ATR et CHK1 induisaient une diminution du niveau d'expression de STAU2. Nous avons rapporté que dans le cas de l'inhibition d'ATR cette diminution n'a lieu qu'au niveau transcriptionnel. Au contraire dans le cas de l'inhibition de la kinase CHK1 cette diminution semble avoir également lieu au niveau protéique. Le mécanisme sous-jacent n'a pas été identifié. Cependant, nous avons montré que cette diminution est indépendante de l'apoptose. De plus, elle apparaît plus rapidement que la demi-vie de la protéine STAU2, laissant présager l'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnelle (392). Finalement, nous avons montré que la diminution de STAU2 facilite l'entrée des cellules en apoptose (392). Ces différentes observations supportent l'idée selon laquelle STAU2 serait probablement une protéine liée au DDR.

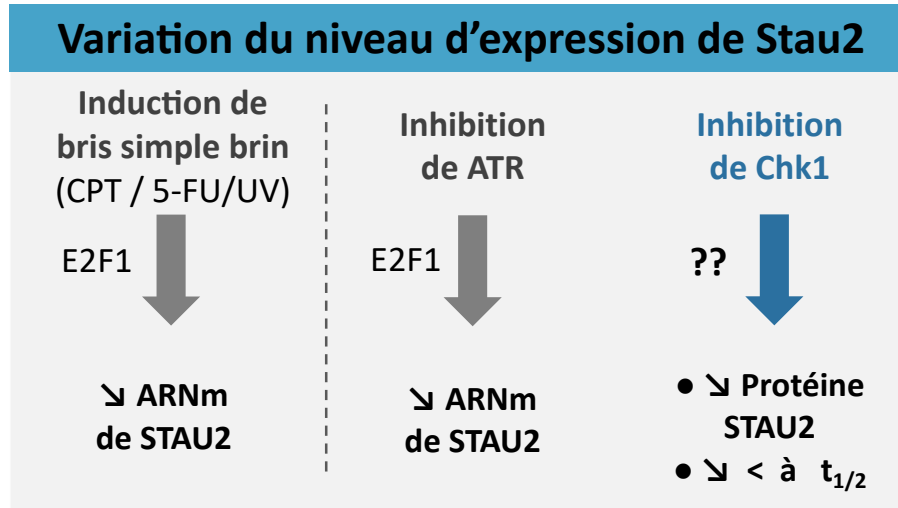


Figure 8. -

**Figure 8 : Aperçu des voies de régulation de l'expression de Staufen 2. (A)** L'expression de Staufen 2 est régulée à différents niveaux. Le schéma ci-dessus représente ces différentes voies. L'induction de bris simple brin à l'ADN par des UV, de la camptothécine (CPT), ou du 5-fluorouracil (5-FU) mène à une diminution de STAU2 au niveau transcriptionnel. Cette diminution est dépendante du facteur de transcription E2F1. L'inhibition de la kinase centrale du DDR, ATR induit elle aussi une diminution de STAU2 au niveau transcriptionnel dépendante de E2F1. L'inhibition de la voie CHK1 induit quant à elle une diminution de STAU2 au niveau protéique dans un temps inférieur à la demi-vie de la protéine.

## Hypothèse de travail

La protéine de liaison à l'ARN double brin STAU2 joue un rôle majeur dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des ARNm. Elle contrôle par exemple leur localisation ou leur stabilité. Elle joue donc un rôle central dans leur devenir via la régulation spatio-temporelle de leur expression. Comme de nombreuses protéines de liaison à l'ARN, STAU2 a ainsi un impact sur divers processus cellulaires dépendant des ARNm qu'elle prend en charge. Il est ainsi primordial que l'expression de STAU2 bénéficie d'une régulation fine.

Il a récemment été découvert que le facteur de transcription E2F1 médiait l'expression de STAU2 via la voie ATR, une voie centrale de la réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi une inhibition de la kinase ATR induit une diminution de STAU2 au niveau transcriptionnel. De façon surprenante, il a été observé à cette occasion que l'inhibition de la voie CHK1 induit également une diminution de STAU2 au niveau protéique. Notre laboratoire a rapporté que cette diminution semble survenir dans un temps nettement inférieur à la demi-vie de STAU2 et est indépendante de l'apoptose. Cette observation présage de l'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnel. Ce mécanisme reste cependant totalement inconnu.

Notre laboratoire a également montré que STAU2 était diminuée au niveau transcriptionnel en présence de dommages à l'ADN simple brins. Ainsi le niveau d'expression de STAU2 est diminué dans plusieurs contextes sans que l'impact de cette diminution ne soit bien compris. Ces observations laissent penser que STAU2 est probablement une protéine impliquée dans les voies de détection et/ou de réparation des dommages à l'ADN. Nous proposons donc l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de régulation par lequel la voie médiée par la kinase CHK1, élément pivot du DDR, peut induire la dégradation de STAU2 via un mécanisme actif. Nous avançons également l'idée que cette diminution de STAU2 joue un rôle dans les mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN.



# Manuscrit

## **STAU2 is a multifunctional RNA binding protein at the crossroad of DNA damage response and cell cycle control**

CONDÉ Lionel<sup>(1)</sup>; BOURDEAU Véronique<sup>(2)</sup>; BEAUJOIS Remy<sup>(3)</sup>; FERBEYRE Gerardo; DESGROSEILLERS Luc

**Contribution des auteurs :** **(1)** Conception, mise au point, réalisation et analyse des expériences présentées aux figures 9, 10, 11, 12, 13 (D-E), 14, S1, S2, S3 et S4. **(2)** Réalisation et analyse des expériences présentées aux figures 13 (A-C) et S5. **(3)** Réalisation de l'expérience présentée à la Figure 12 (D).

### **ABSTRACT**

STAU2 is an RNA binding protein involved in several cellular processes through the post-transcriptional regulation of gene expression. Interestingly, recent data reported that STAU2 binds various mRNA involved in DNA damage response pathways and cell cycle regulation. This observation suggests that STAU2 dysregulation could impair these two cellular processes. Here we report that STAU2 downregulation promotes cell cycle progression and leads to DNA damage accumulation in hTert-RPE1 cells. Consistently, loss of STAU2 results in the downregulation of several DDR proteins in these cells. In contrast, in IRM90 cells, STAU2 decrease is sufficient to induce cell cycle arrest and cellular senescence. Strikingly, we reveal that the major kinase of the DDR, CHK1, is necessary to control the steady-state of STAU2 and prevent its caspase-dependent degradation. Moreover, using a large-scale proteomic analysis, we showed that STAU2 is found in close proximity with several proteins involved in the DDR. Taken together our results suggest that STAU2 is necessary to ensure genome integrity and regulate cell proliferation.

## INTRODUCTION

Cells of the human body are always exposed to different endogenous or exogenous sources of DNA damage. Exposition to these harmful agents results in several kinds of DNA alterations including, base modifications, single-strand breaks and double-strand breaks (1). All these damages can interfere with the DNA replication machinery and lead to replicative stress, DNA damage accumulation, mutagenesis, and carcinogenesis (2, 3). Double strand breaks are especially deleterious because they can lead to chromosomal break and rearrangement (4).

Expression of oncogenes or deletion of tumor suppressors can induce dysregulation of the cell cycle and lead to uncontrolled cell proliferation. In this case, DNA damages occur due to the dysregulation of cell cycle checkpoints (5). In order to maintain genomic integrity and promote survival, cells have developed a global mechanism to respond to DNA damages. This global pathway is called DNA damage response (DDR). The DDR is a complex signaling network that detects DNA damage and triggers a cellular response (6). This response includes a reversible arrest of cell cycle progression and the activation of DNA repair pathways (7, 8). Alternatively, if DNA damages are too complex or too numerous to be adequately repaired, cells take drastic measures to avoid their transmission during mitosis. Genetically-damaged cells can engage either cellular senescence or apoptosis (9, 10). Cellular senescence is characterized by a permanent arrest of cell cycle along with morphological, metabolic, and molecular changes (11). On the other hand, apoptosis is a form of programmed cell death that leads to the complete elimination of damaged cells (12). These two pathways constitute a robust antitumoral mechanism.

Five major phosphoinositide 3-kinase related kinases (PIKKs) drive the DNA damage response (1). DNA-PK (*DNA-activated protein kinase*) and ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) respond predominantly to double-strand breaks, whereas ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*) respond to replicative stress and single-strand breaks (13). ATM and ATR have two important downstream effectors responsible for cell cycle



checkpoint regulation, CHK2 and CHK1, respectively (14, 15). Under genotoxic stress, these kinases phosphorylate many substrates, such as the transcription factors p53, E2F1, and NF- $\kappa$ B, or other cell cycle regulators such as the CDC25 family (16-19). Activation of these different effectors is required for several cellular outcomes, including cell cycle arrest, DNA repair, replication control, and cell fate decision (7).

The DNA damage response is highly organized and coordinated. Some proteins of the DDR, such as the sensors, are active at the DNA damage sites. At the opposite, the effectors play a distal function (20). Several signaling proteins are involved in the communication between sensors and effectors. In addition to its spatial organization, the response to DNA damage evolves over time according to the progress of DNA repair (21). In order to support the dynamism of the DDR, the proteins implicated are finely regulated. This regulation occurs mainly through transcriptional regulation, post-transcriptional modification, and modulation of their stability (22-24).

Recent studies revealed that RNA binding proteins (RBP) are involved in DDR regulation, mainly through the post-transcriptional regulation of the DDR genes expression (25). The RBP are known to control various cellular processes via the regulation of their bound mRNAs (*messenger RNA*) (26). In our laboratory, we are interested in the double-strand RNA binding protein Staufen 2 (STAU2) (27). The *STAU2* gene, through differential splicing, generates four different isoforms (28). STAU2 participates in several cellular processes such as mRNA localization, differential splicing, regulation of translation, and mRNA decay (29-33). Interestingly STAU2 binds several mRNAs involved in the DNA damage response and cell cycle regulation (34). STAU2 dysregulation impairs several pathways related to cell proliferation and cell differentiation. For instance, in chicken, *Stau2* downregulation induces small eye development as a consequence of reduced cell proliferation (35). Likewise, in rat neural stem cells, STAU2 regulates the balance between stem cell maintenance and stem cell differentiation. In this case, the downregulation of the protein induces cell differentiation, whereas overexpression induces cell proliferation (36, 37). In a previous publication, we reported that in response to single-strand break induction, STAU2 is downregulated at the transcriptional levels in an ATR and E2F1

dependent manner (38). Interestingly, we have noticed that the steady-state level of STAU2 could be perturbed as a consequence of CHK1 inhibition. We thus became interested in a potential role for CHK1 in the regulation of STAU2 stability.

Herein, we report that STAU2 stability is regulated by the central DDR kinase CHK1. Notably, the downregulation of CHK1 induces the rapid degradation of STAU2 in a caspase-dependent manner. Otherwise, we show that the depletion of STAU2 in hTerT-RPE1 cells leads to an accumulation of DNA damage, a downregulation of several proteins involved in the DDR, and promotes cell cycle proliferation. In addition, the downregulation of STAU2 in IMR90 triggers cellular senescence. Finally, STAU2 is found in close proximity with several proteins involved in the DDR. Altogether, our results suggest that STAU2 functions are at the crossroad between cell cycle regulation and DNA damage response.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plasmids and cloning strategies**

Plasmids coding for STAU252-FLAG3 and STAU259-FLAG3 were previously described (38). To generate the retroviral pMSCVpuro-STAU252-BioID-HA construction, STAU252 was PCR-amplified using Phusion polymerase (NEB) and STAU252-FLAG3 construct as template (FW: 5' TAAGCAGCTAGCATGCTTCAAATAAATCAGATGTTCT 3'; RV: 5' TGCTTAACCGGTCTACCTGAAAGCCTTGAATCCT 3'). The PCR product was purified with NEB purification kit according to the manufacturer's instructions. The purified insert was then double-digested (NheI; AgeI) and cloned into pcDNA3.1 BioID2-HA vector (Addgene; Kyle Roux Lab). Subsequently, the resulting product STAU252-BioID2-HA was PCR-amplified using Phusion polymerase (NEB) and cloned into retroviral pMSCV puromycin vector after EcoRV digestion and blunt ligation (FW: 5' GCTAGCATGCTTCAAATAAAT 3; RV: 5' GTTTAACTTAAGCTTCTATGCG 3'). To obtain

the pMSCVpuro-STAU2-Myc3 construction, three copies of the Myc sequence were introduced into pMSCVpuro-STAU2<sup>52</sup>-FLAG3 after NotI digestion.

### **Generation of STAU2-KO RPE cell lines and genomic sequencing**

STAU2-KO RPE cells were generated by using the CRISPR/Cas9 technique. hTert-RPE1 cells were transfected with a plasmid coding for GFP, Cas9, and a sgRNA targeting exon 7 of the STAU2 gene (Horizon Discovery), using Mirus LT1 (Mirus Bio. LLC). Forty-eight hours post-transfection, GFP positive cells were sorted by FACS (procedure described below) and plated together into a 10 cm dish. Forty-eight hours after the first sorting, cells were once again isolated by FACS, and individual cells were grown into 96-well plates until colonies formed. During all the procedure, cells were grown in conditioned media. The loss of STAU2 expression was monitored by dot blotting using anti-STAU2 antibody.

The genomic DNA of several clones was isolated (Genomic DNA Miniprep Kit, Bio Basic) and PCR-amplified using the Phusion polymerase (NEB) with specific primers flanking the exon 7 of STAU2 (FW: 5' AGCAGAATTCTTGGATAGGATAGAACA GAATTTGG 3'; RV: 5' ATTAGGATCCACACACATAGCAGACAACATAAC 3'). The PCR products were gel purified and cloned into a pBluescript SK (+) vector (Stratagene). Ten clones were randomly chosen and sequenced (Sanger Sequencing Services Genome Québec).

### **Antibodies and reagent**

Primary Antibodies against CHK1 (2G1D5), PARP1 (46D11), H2AX (D17A3), and  $\gamma$ H2AX (20E3) were purchased from Cell Signaling; against GAPDH (0411) and HA (12CA5) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-STAU2 (HPA019155), anti- $\beta$ -Actin (A5441), and HRP-Streptavidin were obtained from Sigma. Primary

MG132 (C2211), iCHK1 (681 637), and DMSO were purchased from Millipore-Sigma; ZVAD-FMK (S7023), Emricasan (S7775), PF47 (PF-477736, S2904) and CHIR124 (S2683) were obtained from Selleckchem.

## **Cell culture**

The human cell lines hTert-RPE1, HCT116, IMR90, and HeLa were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 µg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin (Wisent) (referred later as complete DMEM). Cells were cultured at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. When required, drugs were added to the medium for the indicated periods before harvesting the cells for further analysis. Cells were routinely tested for mycoplasma contamination.

## **DNA transfection and infection**

For transient expression, cells were transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Mirus X2 (Mirus Bio. LLC) at approximately 60% confluency, according to the manufacturer's instructions. After 5-6 hours, the media was replaced with fresh media. For infections, Phoenix cells were transfected at approximately 50% confluency by using lipofectamine 2000, with 10 µg of retroviral plasmids (pMSCV-puromycin) and 5 µg of packaging plasmid. Twelve hours post-transfection, the media was replaced with fresh media. Forty-eight hours, 54 hours, and 70 hours after transfection, virus-containing supernatant from those infected cells were collected, passed through a 0.45 µm filter, and added along with polybrene (8 µg/ml) to target cells (HCT116, hTert-RPE1, IMR90). Forty-eight hours post-infection, cells were treated for at least five days with puromycin (HCT116 and IMR90 2 µg/ml; hTert-RPE1 5 µg/ml).

## **RNAi**

SMARTpool ON-TARGETplus CHK1 siRNA or ON-TARGETplus non-targeting siRNA were purchased from Dharmacon. Target cells were transfected at 60% confluency with siRNA (25nM) using DharmaFECT 1 following manufacturer's instructions. Cells were then cultured for 24h-48. Plasmids coding for shNT and shSTAU2 #1 were previously described (38). Plasmid coding for shSTAU2 #2 was generated as describe here: oligonucleotides (FW: GGATCCCCCAAAGATATGAACCAACCTTCAAGAGAGGTTGGTTCATATCTTTGGGTTTTTTGGAAAGCTT; RV: AGCTTTTCCAAAAACCCAAAGATATGAACCAACCTCTCTTGAAGGTTGGTTCATATCTTTGGGG) were hybridized and cloned into a pMSCVpuro vector previously double digested (BamHI and HindIII). The insertion site is downstream an U6 promoter. Stable cell lines expressing the shRNA were obtained following the infection procedure described above.

## **Protein Electrophoresis and Western blot analysis**

Total cell extracts were prepared in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol [DTT] and a protease inhibitor cocktail [Roche]). The protein concentrations were determined by BCA assays (Thermo Fisher) and adjusted equally. Cell extracts (20 µg) were complemented (ratio 1:1) with Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl at pH 6.8, 2% SDS, 12.5% glycerol, 0.1% Bromophenol Blue, 1% β-mercaptoethanol) ratio 1:1, boiled at 95°C for 5 min and resolved using SDS-polyacrylamide gel (10 or 12%). Following gel migration, proteins were transferred to nitrocellulose membrane and blocked in 5% milk at room temperature. Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C prior to incubation with HRP-conjugated secondary antibody (polyclonal anti-mouse, Dako: P0447; polyclonal anti-rabbit, Dako: P0448) for 1 hour at room temperature. Between each step, membranes were washed three times with TBS-Tween20 0.2% for 5 minutes. Membranes were processed using Perkin Elmer Western Lightning Plus-ECL. Data were collected either on X-ray films (Fujifilm) or with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories). The western blot signals were quantified with the ImageLab (Bio-Rad

Laboratories) software or with ImageJ software (NIH.gov). Primary antibodies were prepared with 1% (w/v) skim milk in TBS-Tween20 (0,2%), secondary antibodies were prepared extemporaneously with 2,5% (w/v) skim milk in TBS-Tween20 (0,2%). For the detection of biotinylated proteins by western blot, the membranes were blocked in PBS-BSA 5% and incubated with HRP-streptavidin 0.3% in PBS-BSA 3% for 45 min at room temperature. Membranes were wash in PBS-Tween20-BSA 3% for 5 minutes to avoid nonspecific signals, and then three times 5 minutes in PBS-Tween20. Membranes were processed as describe above for protein detection.

### **RNA isolation and RT-qPCR**

Total RNA was isolated from cell extracts using the Geneaid extraction kit. Purified RNA was resuspended in 40 µl of water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). RNA concentration was measured by spectrophotometry on a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher). Reverse transcription reactions were done with 1 µg of RNA using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific), according to the manufacturer's procedure. qPCR was performed with Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB) on a LightCycler 96 instrument (Roche). Samples were run in triplicates and normalized to actin expression. All steps were done according to the manufacturer's procedures. Sense and antisense primer pairs used for qPCR amplification are listed in Supplementary Table S1.

### **Cell growth assay and Senescence Determination**

To determine cell proliferation rates, cells were plated at the same confluency (HeLa: 5000 cells; hTert-RPE1: 8000 cells; IMR90:10 000 cells) and were allowed to grow up to 9 days. (Figure F12B-D; F13A, FS5B): we estimated cell counts at different times after plating using a crystal violet retention assay (39). Briefly, cells were washed two times with PBS, fixed 10 min using 1% (v/v) glutaraldehyde in PBS, washed two times with PBS and stained with 0,1% (w/v) crystal violet in PBS for 1 hour. Plates were washed

with tap water, dried for 2 days and then decolorized in a solution containing 10% (v/v) acid acetic in distillate water. The DO was measured at 590 nm. (Figure 12A): cells were harvested every day and the number of cells was counted with an automated hemacytometer. Senescence-associated-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity was assayed as described by (40). Data were quantified from 200 cells counts in two independent experiments.

### **Cell synchronization and FACS analysis**

To synchronized hTert-RPE1 cells in S phase or at the G<sub>2</sub>/M border, cells were first synchronized at the G<sub>1</sub>/S phase border using a double thymidine-block (DTB) protocol. hTert-RPE1 (60% confluency), cells were treated with 5 mM thymidine for 16 h and released for 8 h in fresh medium before the second thymidine block was performed for another 16 h. In a second time, cells were then washed three times in phosphate buffered saline (PBS) and released in fresh medium for 3 hours (S phase) or for 5 hours (G<sub>2</sub>/M phase border). Cell cycle distribution was determined by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Cells were washed 2 times in PBS, trypsinized and resuspended PBS BSA 1%. After several washes in PBS-BSA 1%, cells were fixed in 70% EtOH (v/v) and incubated at 4°C for 1 hour. Cells were washed in PBS and resuspended in PBS containing 100  $\mu$ g/ml RNase A (Invitrogen) for 30 min at 37 °C. One drop of propidium iodide was added in each tube and 30 000 cells were analyzed on a BD FACSCanto II apparatus (BD Biosciences). The data were then processed with FlowJo software (V10).

### **BiID2 sample preparation**

For each analysis, two biological replicates were processed independently. The sample preparation protocol was adapted from (41). Briefly, a stable cell line expressing the construction STAU2<sup>52</sup>-BiID-HA were generated by retroviral infection (as described above). Four 15cm cell plates at 80% confluency were used for each condition. BiID samples were labeled using 50  $\mu$ M biotin for 16 h. Cells were lysed in 700  $\mu$ L RIPA lysis

buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1× protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich). Cell lysates were sonicated three times 15 seconds at the lowest intensity. To enrich biotinylated material, 250 µL streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) were prewashed twice in lysis buffer and then incubated with clarified lysates containing 9 mg protein at 4 °C overnight (with rotation). The beads were then washed twice with 1 mL of RIPA lysis buffer, once with 1 mL of 1 M KCl, once with 1 mL of 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, once with 1 mL of 2 M urea in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and twice with 1 mL RIPA lysis buffer. The beads were then resuspended in 100 µL 50 mM ammonium bicarbonate solution, transferred to a new Eppendorf tube (low binding), and shipped to IRIC or IRCM proteomic core facility for LC-MS/MS analysis. The samples were stored at -80°C before analysis.

### **BiO2 digestion and LC-MS/MS**

The on-bead proteins are digested with 1 µg Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega) overnight at 37°C with agitation. The supernatants were collected and the beads were washed two times with 100 µL water. The supernatants of each wash were pooled and then reduced and alkylated. The reduction step is done with 9 mM dithiothreitol at 37°C for 30 minutes and, after cooling for 10 minutes, the alkylation step is done with 17 mM iodoacetamide at room temperature for 20 minutes in the dark. The supernatants were acidified with trifluoroacetic acid for desalting and removal of residual detergents by MCX (Waters Oasis MCX 96-well Elution Plate) following the manufacturer's instructions. After elution in 10% ammonium hydroxide /90% methanol (v/v), samples were dried with a Speed-vac, reconstituted under agitation for 15 min in 15 µL of 5%FA and loaded into a 75 µm i.d. × 150 mm Self-Pack C18 column installed in the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems). The buffers used for chromatography were 0.2% formic acid (buffer A) and 90% acetonitrile/0.2% formic acid (buffer B). Peptides were eluted with a two slope gradient at a flowrate of 250 nL/min. Solvent B first increased from 1 to 35% in 105 min and then from 35 to 84% B in 15 min. The HPLC



system was coupled to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific) through a Nanospray Flex Ion Source. Nanospray and S-lens voltages were set to 1.3-1.8 kV and 50 V, respectively. Capillary temperature was set to 225 °C. Full scan MS survey spectra (m/z 360-2000) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 70 000. The 16 most intense peptide ions were fragmented in the collision cell and MS/MS spectra were analyzed in the Orbitrap.

### **Protein identification**

The peak list files were generated with Proteome Discoverer (version 2.1) using the following parameters: minimum mass set to 500 Da, maximum mass set to 6000 Da, no grouping of MS/MS spectra, precursor charge set to auto, and minimum number of fragment ions set to 5. Protein database searching was performed with Mascot 2.6 (Matrix Science) against the Uniprot human protein database (May 16<sup>th</sup>, 2018). The mass tolerances for precursor and fragment ions were set to 10 ppm and 0.6 Da, respectively. Trypsin was used as the enzyme allowing for up to 1 missed cleavage. Cysteine carbamidomethylation was specified as a fixed modification, and methionine oxidation as variable modifications. Data interpretation was performed using Scaffold (version 4.8.9).

### **Epifluorescence microscopy**

For microscopy experiments, cells infected with the indicated constructs were seeded onto 12 × 12 mm glass coverslips in 6-well plates and incubated overnight at 37°C. Cells were fixed in 4% PFA for 15 minutes at room temperature and then permeabilized in 10 mM Tris (pH 7.5), 0.5% Triton-X-100 (v/v) and 0.1% BSA (w/v) for 10 minutes. Cells were blocked in 3% BSA for one hour at room temperature. Cells were then stained with anti-myc (1:600; homemade) or anti-HA: (1:500; 12CA5; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. After 3 washes in PBS 3% BSA, the secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat) was added for 1h at room temperature. All antibodies were diluted in blocking

solution. Coverslips were washed once with PBS and incubated for 10 min with PBS containing DAPI (0.5 µg/ml) at room temperature. Coverslips were mounted using Dako mounting medium (Dako Faramount Aqueous Mounting Medium; S3025). Images were acquired with an ECLIPSE TE2000U microscope (NIKON). Images processing was performed using Metamorph (Molecular Devices) or ImageJ software. The data are representative of at least 15 fields of view.

## RESULTS

### **Decrease of STAU2 protein level in response to CHK1 pathway inhibition**

To investigate the effect of CHK1 pathway inhibition on STAU2 expression, we initially treated the colorectal carcinoma cell line HCT116 with several CHK1 inhibitors. Cells were incubated with three different CHK1 inhibitors (iCHK1, PF47, and CHIR124) for eight hours. The vehicle, DMSO, was used as control. Cell extracts were then analyzed by Western blotting. Our results showed that STAU2 protein level decreased with the three different CHK1 inhibitors (Figure 9A and 9B). As carcinoma cell lines are known to have perturbed DDR pathways (A), we repeated the same experiment with an un-transformed cell line: hTert-RPE1. hTert-RPE1 cells were incubated with the CHK1 inhibitor PF47 for eight hours and analyzed by Western blotting. A similar decrease in STAU2 expression was observed (Figure 9C and 9D). This observation rules out the possibility that STAU2 downregulation is cell-type specific. For both cell lines, all STAU2 isoforms were similarly affected. Moreover, we noticed that the decrease of STAU2 in response to CHK1 inhibition happened without significant cleavage of PARP1, indicating that this effect is independent of apoptosis. To evaluate the effect of CHK1 inhibition on a longer period, we also treated HCT116 and hTert-RPE1 cells with the CHK1 inhibitors PF47 and CHIR124 for forty-eight hours, and quantified STAU2 expression by Western blotting. As described above for a short treatment, inhibition of CHK1 for an extended period of time caused a decrease in STAU2 expression (Supplementary Figure S1A-F). To confirm that the chemical inhibitors target CHK1, we transfected HCT116 and hTert-RPE1 cells with

non-targeting control siRNAs or siRNAs against CHK1. Although CHK1 was only partly silenced, STAU2 protein levels decreased (Supplementary Figure S2A-D).

Next, to determine if the decrease in STAU2 expression first occurs at the transcriptional level, we quantified STAU2 mRNA level in response to CHK1 inhibition by RT-qPCR. HCT116 and hTert-RPE1 cells were incubated for six hours with the CHK1 inhibitor PF47 and then analyzed by RT-qPCR and Western blotting. Interestingly, STAU2 mRNA levels remained unchanged in response to CHK1 inhibition indicating that the decrease did not occur at the transcriptional level (Figure 9E and 9F). In contrast, STAU2 protein level is decreased by approximately 50% at six hours post-treatment. This time-lapse is considerably inferior to the half-life of the protein ( $\cong$ 20 hours). Altogether these results indicate that the CHK1-dependent decrease of STAU2 occurs at the protein level and predicts the involvement of an active degradation mechanism.

### **Caspases are involved in STAU2 degradation**

To determine the mechanism involved in the decrease of STAU2 in response to CHK1 inhibition, we tested a series of pharmacological inhibitors known to target the major protein degradation pathways. We first targeted the proteasomal and lysosomal degradation pathway. HCT116 cells were incubated with the proteasome inhibitor MG132 or with the lysosome inhibitor iLYS for two hours. Then, the CHK1 inhibitor PF47 was added to the cultures for an additional eight hours. The vehicle DMSO was used as control. STAU2 protein level was analyzed by Western blotting. Unexpectedly, as observed in Figure 10A-D, the proteasome and lysosome inhibitors did not prevent STAU2 degradation following CHK1 inhibition. Therefore, HCT116 cells were simultaneously incubated with the pan-caspase inhibitor ZVAD and with the CHK1 inhibitor PF47. Interestingly, the inhibition of caspases prevented STAU2 degradation in response to CHK1 inhibition, indicating that caspases are involved in the degradation of STAU2 following CHK1 inhibition. (Figure 10E and 10F). Inhibition of caspases was confirmed by the stabilization of PARP1, a known target of caspase 3.

To further investigate the caspase-dependent degradation of STAU2, HCT116 cells were incubated with ZAVD for a longer period. Cells were collected at different time points and analyzed by western blotting. Inhibition of pan-caspase alone induced the stabilization of STAU2. Moreover, we identified a 42 kDa fragment of STAU2, which totally disappeared after eight hours of caspase inhibition (Figure 10G). A similar observation was done with another pan-caspase inhibitor (EMR: Emricasan) (Figure 10H).

To get more insight into the molecular mechanism involved in caspase-dependent cleavage of STAU2, we expressed STAU2<sup>59</sup>-FLAG<sub>3</sub> in HCT116 cells, in the presence or not of the pan-caspase inhibitor Emricasan for 24h. Cells were collected and analyzed by Western Blotting. In the absence of treatment, we observed fragments of 42 kDa and 15 kDa with antibodies that recognize the N- and C-terminal extremities of STAU2, respectively. Both fragments disappeared under pan-caspase inhibition (Supplementary Figure S3A). These observations suggest the presence of a caspase-cleavage site in the C-terminal part of STAU2. This supposition is consistent with the prediction of 3 caspase sites in this area (Supplementary Figure S3B). Altogether our results suggest that STAU2 is a substrate of caspase even in normal conditions.

### **STAU2 depletion increases $\gamma$ H2AX levels and downregulates several DDR proteins**

Our data indicate that STAU2 expression decreases as a result of CHK1 inhibition. Therefore, we determined whether STAU2, as a downstream effector in the CHK1 pathway, participates in DNA damage response or DNA damage repair. To address this question, we generated a STAU2-KO hTert-RPE1 cell line using the CRISPR/Cas9 technique. hTert-RPE1 cells were transfected with a plasmid expressing CRISPR/Cas9 and an RNA guide targeting exon 7 of STAU2. This exon is just downstream of the AUG initiation codon and is shared by all STAU2 isoforms, which guarantees the total depletion of STAU2. Individual clones were isolated and tested for STAU2 expression by dot blotting (Supplementary Figure S4A) and Western blotting (data not shown). We obtained 15 clones negative for STAU2 expression (26%). We quantified STAU2 mRNA level in each STAU2-KO clones by RT-qPCR. STAU2 mRNA level was decreased in all

clones, suggesting that the depletion of STAU2 is effective (Supplementary Figure S4A-B). STAU2-KO cells were viable without observable morphological perturbation (data not shown). We then characterized two of the STAU2-KO clones at the genomic level (Figure 11 A). The first clone had a single nucleotide deletion in each allele. The second clone presented a deletion of 5 nucleotides in one and a deletion of 26 nucleotides in the other allele. In both cases, these frameshift mutations induced the apparition of a premature stop codon.

To highlight a putative link between STAU2 and the DDR pathway, we looked for the presence of  $\gamma$ H2AX, a marker of DNA damage. Interestingly when we analyzed the STAU2-KO cells by Western blotting, we noticed a 1.5-fold increase in the level of  $\gamma$ H2AX compared to that in WT cells (Figure 11B and 11C). We observed the same phenotype in all STAU2-KO clones. This observation suggests that the depletion of STAU2 might induces DNA-damage. To confirm the increase of DNA damage in response to STAU2 depletion,  $\gamma$ H2AX foci should be quantified and monitored using immunofluorescence techniques. As STAU2 is a putative post-transcriptional regulator of several DDR genes, we used RT-qPCR to monitor their expression in STAU2-KO cells compared to WT cells. Figure 11D clearly showed a decrease in the mRNA level of different genes required for DNA repair in two different STAU2-KO clones, indicating that STAU2 depletion could have a negative impact on the DDR pathway, which, potentially, explains the accumulation of  $\gamma$ H2AX.

### **STAU2 depletion promotes cell proliferation and impairs cell cycle checkpoints in un-transformed epithelial cell line**

To investigate the impact of increased DNA damage following STAU2 depletion in hTert-RPE1 cells, we studied the effect of its depletion on cell cycle proliferation. First, we performed a growth curve assay with STAU2-KO and WT cells. Interestingly, we found that STAU2-KO cells proliferated faster than wild type cells, indicating that STAU2 depletion interferes with cell cycle progression and potentiates cell growth (Figure 12A). Similar conclusions were reached when proliferation was studied with 3 different STAU2-

KO clones using the colony formation assay. After ten days, the relative number of cells in the STAU2-KO condition was increased by 1.5-fold (Figure 12B). This observation indicates that STAU2 depletion promotes proliferation in hTert-RPE1 cells. To confirm the impact of STAU2 depletion on cell proliferation, the un-transformed cell line hTert-RPE1 and the tumor cell line HeLa were infected with shRNA control or shRNA against STAU2. Proliferation of infected cells was followed for ten days. As observed for STAU2-KO RPE cells, STAU2 downregulation by shRNA induced an increase of cell proliferation in hTert-RPE1 cells. In contrast, STAU2 downregulation had no impact on cell proliferation in HeLa cells (Figure 12C and 12D). This result indicates that STAU2 downregulation only impacts cell cycle progression in untransformed cells.

To get more insights into the mechanism promoting hyperproliferation of STAU2-KO hTert-RPE1 cells, we analyzed two STAU2-KO clones by flow cytometry. Cells were first synchronized at the in G<sub>1</sub>/S checkpoint by double block thymidine (DBT) and then released for different times to reach S phase (3h) or G<sub>2</sub> phase (6h). FACS analysis revealed that, after 6 hours of release, a more important number of cells reached the G<sub>2</sub> phase in the STAU2-KO cells compared to wild cells: 56% vs. 44% (Figure 12E). No difference was found in asynchronous cells. This observation indicates that the STAU2-KO RPE cells seem to reach the G<sub>2</sub> phase faster than the wild type cells.

To determine whether this phenotype is reversible, STAU2-KO cells were infected with a STAU2<sup>52</sup>-Flag<sub>3</sub> construction. Twenty-four hours after the end of the selection, infected cells were synchronized as above and analyzed by FACS. Interestingly, these rescued cells did not reach the G<sub>2</sub> phase faster than the wild type cells (Figure 12E). Moreover, these cells showed a weaker hyperproliferative phenotype (data not shown). Collectively, these findings indicated that STAU2 depletion promoted hTert-RPE1 cell proliferation. This hyperproliferative phenotype is associated with a dysregulation of the cell cycle progression.

### **Downregulation of STAU2 trigger senescence in IMR90 cells**

To determine if the hyperproliferative effect induced by STAU2 downregulation is cell type-specific, we decided to downregulate STAU2 expression in the human diploid fibroblast IMR90. These cells were infected with viruses expressing shRNA control (shNT) or shRNA against STAU2 (shSTAU2). Proliferation was followed during seven days using a crystal violet retention assay. IMR90 cells expressing shSTAU2 displayed a decrease in their cell growth capacity when compared to cells expressing non-targeting shRNAs (Figure 13A). To determine if this decrease in cell proliferation is due to induction of senescence, we performed a beta-galactosidase assay. As observed in Figure 13B and 5C, STAU2-depleted IMR90 cells developed a positive staining for beta-galactosidase. Moreover, as clearly showed figure 5A, they adopted a typical morphology of senescent cells. A similar phenotype was observed with a second shRNA targeting a different part of STAU2 mRNA (Supplementary Figure S5AB). We then monitored, by RT-qPCR, the level of different genes known to be regulated as a consequence of induction of senescence. IMR90 cells expressing NT- or STAU2-shRNAs were collected ten days after infection and analyzed by RT-qPCR. First, we observed that several genes involved in the cell cycle were downregulated in STAU2-depleted cells compared to control cells (Figure 13D). We also observed that expression of various genes required for DNA repair was decreased in response to STAU2 downregulation. All these observations indicate that STAU2 downregulation triggers senescence in IMR90 cells.

### **STAU2 is found in close proximity with several proteins involved in the DDR**

Little is known about STAU2 interactors. To upgrade our knowledge, we look for new STAU2 partners using an affinity purification approach coupled to protein identification by mass spectrometry. hTert-RPE1 cells were infected with a virus expressing STAU2<sup>52</sup>-BIOID2-HA. In the presence of biotin, the biotinylase included in the fusion protein covalently adds biotin on proteins found within a range of 10 nm from STAU2-biotinylase. To validate the experiment, we first confirmed that the fusion protein was properly working (Figure 14A). In the presence of biotin in the culture media, the level of

biotinylated protein increased, whereas the level of biotinylation in the absence of biotin was low. We also verified that the localization of the fusion protein was comparable to the localization of STAU2<sup>52</sup>-Myc<sub>3</sub> by inflorescent microscopy (Figure 14B). Then, we incubated cells with biotin for 16h. Cells were collected, and a pull-down of biotinylated proteins was realized with streptavidin-coupled magnetic beads. Labeled proteins were identified by mass spectrometry. In addition to previously described interactors, we found several DDR factors in proximity to STAU2 (Figure 14C). We confirmed the interaction probability using SAINT analysis, and we eliminated the potentials off-targets using the online tool CRAPOME. Interestingly, we identified several complexes involved in the same DDR process as MSH2/MSH6 or DNA-PK/Ku70/Ku80 (Figure 14D, and 14E). We also identified a large number of proteins involved in RNA metabolism and replication process (data not shown).

## **DISCUSSION**

We report here that STAU2 is a DNA damage response effector involved in cell cycle proliferation. RNA binding proteins are major players in the cellular process through the post-transcriptional regulation of gene expression (26). Because RBP dysregulation can impair several cell pathways, they are themselves highly regulated (42). In this manuscript, we show that STAU2 expression is rapidly decreased after CHK1 inhibition. Our data indicate that STAU2 downregulation does not occur at the transcriptional levels and involves a caspase-dependent mechanism.

Interestingly, we found that STAU2 levels decline before PARP1 cleavage, indicating that STAU2 decrease is not a consequence of apoptosis. Otherwise, we report that the depletion of STAU2 has an impact on cell cycle proliferation in a cell type-specific manner. In hTert-RPE1 cells, the depletion of STAU2 promotes proliferation, whereas in IMR90 cells, its downregulation stops the cell cycle progression and triggers a



senescence program. Moreover, STAU2 depletion in hTert-RPE1 cells induces a decrease in the expression of various proteins involved in DNA repair and promotes the accumulation of  $\gamma$ H2AX. Finally, using an affinity purification coupled to mass spectrometry approach, we established that STAU2 has several interactors involved in the DNA damage response pathway.

### **STAU2 stability is mediated by the CHK1 pathway**

Our results indicate that the downregulation of CHK1 kinase by pharmacological inhibitors or siRNA induces a rapid decrease of STAU2 expression. CHK1 is one of the five major kinases involved in the DNA damage response (20). In the presence of single-strand breaks or replication stress, CHK1 is activated by ATR, its upstream regulator (14). Together, they prevent genomic instability, promoting cell cycle arrest and DNA repair (43). When activated, CHK1 negatively controls cell cycle and modulates various pathways involved in DNA damage response by phosphorylation (43, 44). In unstressed cells, CHK1 is involved in cell cycle control, especially in S phase, where the kinase is required for origin firing (45). CHK1 is essential for cell survival in dividing cells (46). Inhibition of CHK1 pathway induces several dysregulations, including the accumulation of DNA damage and the induction of apoptosis (47, 48). Here, we showed that a STAU2 decrease occurs without significant PARP cleavage, indicating that STAU2 downregulation in response to CHK1 inhibition occurs before the induction of apoptosis. Considering that CHK1 inhibition induces a STAU2 decrease independently of apoptosis, our results suggest that CHK1 is required to maintain the STAU2 expression level.

Then, the central question was then how CHK1 inhibition induces STAU2 downregulation. The stability of proteins can be regulated at several levels including, transcriptional, post-transcriptional and post-translational level (49-51). CHK1 is known to participate in both regulation pathways. For example, in a DNA damage context, CHK1 participates in transcriptional regulation through the stabilization of various transcription factor such as p53 and NF- $\kappa$ B (52, 53). CHK1 also regulates the stability of several proteins at the post-translational level. For example, under genotoxic stress, CHK1

mediates CDC25A degradation (54). Our data showed that STAU2 downregulation in response to CHK1 inhibition occurs within a time inferior to the half-life of the protein and without a decrease in STAU2 mRNA levels. These observations indicate that STAU2 diminution occurs at the post-translational level. From this observation, we hypothesized that STAU2 downregulation occurs via an active degradation mechanism. To address this question, we tested different protein degradation pathways. First, we examined proteasomal and lysosomal degradation. Our result clearly showed that these pathways are not involved in STAU2 downregulation in response to CHK1 inhibition. As a previous publication from our laboratory suggested that STAU2 downregulation could promote apoptosis (38), we hypothesized that STAU2 degradation could be caspase-dependent. To address this question, we induced CHK1 inhibition in the presence of a pan-caspase inhibitor. Interestingly we report that under these conditions, STAU2 degradation is prevented. Caspases are cysteine proteases well known for their implications in the apoptotic process. When apoptosis is induced, caspase cleaves several targets to facilitate the progression of the cell death process (55). More recently, several groups have reported that caspases have different functions outside apoptosis (56). Altogether, our data show that the CHK1-mediated STAU2 decrease occurs at the protein level in a caspase-dependent manner. Subsequently, we reported that the caspase cleavage site is probably located in the C-terminal part of STAU2. This observation is also consistent with a bioinformatic cleavage prediction.

The mechanism by which CHK1 protects STAU2 from caspase degradation remains to be elucidated. Given that the major function of CHK1 involves phosphorylation of substrates, we supposed that STAU2 could be a target of CHK1. To test this supposition, we realized an in-vitro kinase assay. Unfortunately, we did not observe direct phosphorylation of STAU2 by the CHK1 kinase (data not shown). In order to learn more about STAU2 interactors, we used an affinity purification coupled to mass spectrometry technique called BioID. This technique is particularly interesting for catching weak interactions (57). Although we have not identified CHK1 kinase, we have found several proteins directly regulated by CHK1 such as CDK1 and Aurora B (43). Interestingly, CHK1 is known to regulate the activity of the RNA binding protein HuR in the presence of DNA

damage via the regulation of CDK1 (58). Moreover, we previously reported that STAU2 could be a direct target of CDK1 (59). Altogether, these observations support that the regulation of STAU2 stability could be mediated by a CHK1 effector.

### **STAU2 regulates cell cycle proliferation: one player, two consequences**

Cell division is a complex process that requires several levels of regulation. Cell cycle effectors are usually regulated at the transcriptional or post-transcriptional level (60). RNA binding proteins are known to participate in several steps of the post-transcriptional regulation of gene involved in the cell cycle. Our data report that STAU2 plays a role in cell cycle regulation in a cell type-specific manner.

To more precisely study the effect of STAU2 depletion on cell behavior, we first generated a STAU2-KO hTert-RPE1 cell line using the CRISPR/CAS9 system. Interestingly, we noticed that these cells proliferate significantly faster than wild type cells. Moreover, the progression of these cells through the G<sub>1</sub> and S phase was accelerated. In this context, these observations could be consistent with a tumoral transformation process and should be more investigated (61). To determine if this phenotype was cell type-specific, we downregulated STAU2 in IMR90 cells with shRNA. Surprisingly, IMR90 cells infected with shRNA against STAU2 showed a slower proliferation rate and triggered a cellular senescence program. At first look, it seems that STAU2 downregulation has two opposite effects on cell cycle proliferation. Different explanations could justify this apparent contradiction.

Several groups report the implication of RBPs in the regulation of many aspects of the cell cycle proliferation (62, 63). A common point in all these observations was that in most cases, RBPs control the cell cycle through the regulation of proto-oncogene expression (64). Effectively, RBPs can control the fate of various mRNAs. While RBPs are dysregulated, their bound mRNAs are released into the cytoplasm. In some cases, these mRNAs will be targeted to degradation, whereas in other cases, they will be abnormally translated. This post-transcriptional dysregulation of gene expression can impair diverse

cellular pathways such as the cell cycle (42, 64, 65). Interestingly, several RBPs, including STAU2, are known to bind various mRNAs coding for proteins involved in cell cycle regulation and cell cycle proliferation (34, 64). Some of these proteins have proto-oncogene or tumor suppressor functions.

The expression of proto-oncogenes is known to promote cell cycle proliferation. This hyperproliferative phenotype is often followed by an accumulation of DNA damage due to the loss of the cell cycle checkpoints (5, 66). Therefore, we can hypothesize that the hyperproliferative effect of STAU2 depletion in hTer-RPE1 cells is due to the dysregulation of a STAU2-bound RNA involved in cell cycle regulation. This dysregulation could trigger an oncogenic stimulus leading to neoplastic transformation. Moreover, this hypothesis could explain the accumulation of  $\gamma$ H2AX observed in our hTer-RPE1 STAU2-KO cells.

The increase in cell proliferation is not the only cellular response to oncogenes expression. Indeed, activation of oncogenes can also trigger cellular senescence (67). For example, expression of oncogenes as RAS or RAF causes IMR90 cells to enter into senescence (68, 69). Cellular senescence is characterized by a permanent arrest of the cell cycle in G<sub>1</sub>. Senescent cells adopt molecular, morphological, and metabolic changes. Cellular senescence is an essential antitumoral mechanism by preventing uncontrolled cell proliferation (11, 70). Consistent with our first hypothesis, the senescence observed in IMR90 cells in response to STAU2 downregulation could be promoted by the uncontrolled expression of an oncogene. Thereby oncogenes could make the connection between the two apparently opposite phenotypes observed in hTer-RPE1 and IMR90 cells. Moreover, we found that the downregulation of STAU2 has no effect on the proliferation of HeLa or HCT116 cells (data not shown for HCT116 cells). These two transformed cell lines are known to be very dysregulated and permanently stimulated by oncogene stimulus (71, 72). Thus, it is no wonder that an additional oncogene stimulus has no effect on their proliferation.

Although the potential oncogenes or tumor suppressors involved in these different mechanisms remain to be identified, several discoveries support our hypothesis. A group

recently reported that dysregulation of the TGF-beta pathway in RPE1 cells can lead to cell cycle dysregulation and tumoral transformation (73). In parallel, several other groups report that TGF beta pathway dysregulation can be involved in senescence (74, 75). Interestingly STAU2 binds 26 mRNAs involved in the TGF- $\beta$  pathway, including the central protein TGF- $\beta$  receptor I (34). The dysregulation of the TGF- $\beta$  pathway following STAU2 depletion could explain the two different phenotypes.

### **STAU2 copurifies with several factors of the DDR pathway**

Until now, little was known about STAU2 cofactors. To fill this lack of knowledge, we decided to analyze STAU2 interactors in hTert-RPE1 cells using a proximity labeling approach (BioID). This technique is very useful because, as discussed above, it permits to identify even weak and transient interactions (57). Our data show that STAU2 copurifies with a network of factors involved in the DDR. Interestingly, most of these proteins are implicated in proximal response to DNA damage, suggesting that STAU2 colocalizes near DNA damage foci. The most relevant interacting complex found is DNA-PK/Ku70/Ku80. In the presence of double-strand breaks, the heterodimer KU70-KU80 binds onto broken DNA extremity within a few seconds. This binding promotes the recruitment of the major DDR kinase DNA-PK (76). Together, they promote DNA repair by non-homologous end-joining pathway (NHEJ) (77). We also identified the protein PARP1 among STAU2 interactors. PARP1 is involved in the first steps of DNA damage signaling (78), reinforcing the possibility of the localization of STAU2 near DNA damage foci. Although proteomics studies highlight the importance of RBPs in the regulation of the DDR, their implication near the DNA repair foci is not well characterized (79). Several hypotheses could explain their presence next to DNA damage sites considering recent discoveries. First, RBPs, including STAU2, are known to bind long noncoding RNA (lncRNA) (80). Several studies have revealed their importance in the DNA damage repair process (81). In some cases, lncRNA act as scaffolds for DNA repair protein recruitment. For example, a recent study shows that the lncRNA LINP1 participates in DNA-PK recruitment to DSB (82). In other cases, lncRNA play a role in chromatin modification,

which is an indispensable step for the DNA repair process (83). In the light of these observations, we can hypothesize that RBPs as STAU2 could be required to localize lncRNA at the DNA damage sites in order to support the repairs process. Second, RBPs are involved in R-Loop formation. Indeed, collisions between the transcription machinery and the replication fork are frequent. R-Loop formation triggers the recruitment of the DDR factors, which could interact with RBPs in this way (84). Surprisingly, in our proximity labeling experiment, besides proximal repair proteins, we also identified several proteins involved in the replication process. Consistent with this observation, STAU2 could be involved in R-Loop formation. Overall, we report a new function for STAU2 at the intersection of cell cycle regulation and genomic stability.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Zhang Xin and Dr. Beaujouis Remy for useful suggestions, Louise Cournoyer for help with cell culture, Alicia Pellerin-Viger, Bellastrid Doran, Yulemi Gonzalez Quesada for technical assistance, and Dr. Le Campion Armelle for her support with flow cytometry. We also thank the proteomic core facilities at the Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM) and at the Institut de Recherches en Immunologie et Cancer (IRIC) for the proteomics analysis. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by the Bristol-Myers-Squibb chair to LDG.

## REFERENCES

1. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
2. Aguilera A, Gómez-González B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(3):204-17.
3. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(15):8241-6.
4. Cannan WJ, Pederson DS. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):3-14.
5. Hills SA, Diffley JF. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R435-44.
6. Sirbu BM, Cortez D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):a012724.
7. Lanz MC, Dibitetto D, Smolka MB. DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *Embo j*. 2019;38(18):e101801.
8. Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO journal*. 2008;27(4):589-605.
9. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):440-50.
10. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(1):111-7.
11. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
12. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2000;301(1):5-17.
13. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-17.
14. Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(13):4129-39.
15. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10389-94.
16. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(5):10.1101/cshperspect.a026070 a.
17. Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1071-9.
18. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):209-20.
19. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007;316(5828):1160-6.

20. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
21. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. 2011;25(5):409-33.
22. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & development*. 2011;25(5):409-33.
23. Christmann M, Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic acids research*. 2013;41(18):8403-20.
24. Huen MSY, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Research*. 2008;18(1):8-16.
25. 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;429(21):3139-45.
26. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*. 2014;15(12):829-45.
27. Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufer protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics*. 1999;62(1):113-8.
28. 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;115(Pt 16):3285-95.
29. Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. A role for a rat homolog of staufer in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron*. 2001;32(3):463-75.
30. O'Leary DA, Sharif O, Anderson P, Tu B, Welch G, Zhou Y, et al. Identification of small molecule and genetic modulators of AON-induced dystrophin exon skipping by high-throughput screening. *PLoS One*. 2009;4(12):e8348.
31. Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, et al. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*. 2006;172(2):221-31.
32. Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, et al. Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn Mem*. 2011;18(5):314-26.
33. 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;110(2):405-12.
34. 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;14(2):324-35.
35. Cockburn DM, Charish J, Tassew NG, Eubanks J, Bremner R, Macchi P, et al. The double-stranded RNA-binding protein Staufen 2 regulates eye size. *Mol Cell Neurosci*. 2012;51(3-4):101-11.
36. Vessey JP, Amadei G, Burns SE, Kiebler MA, Kaplan DR, Miller FD. An asymmetrically localized Staufen2-dependent RNA complex regulates maintenance of mammalian neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;11(4):517-28.



37. Kusek G, Campbell M, Doyle F, Tenenbaum SA, Kiebler M, Temple S. Asymmetric segregation of the double-stranded RNA binding protein Staufen2 during mammalian neural stem cell divisions promotes lineage progression. *Cell Stem Cell*. 2012;11(4):505-16.
38. Zhang X, Trepanier V, Beaujois R, Viranaicken W, Drobetsky E, DesGroseillers L. The downregulation of the RNA-binding protein Staufen2 in response to DNA damage promotes apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(8):3695-712.
39. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*. 2000;14(16):2015-27.
40. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(20):9363-7.
41. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*. 2018;36(9):880-7.
42. Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet*. 2008;24(8):416-25.
43. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(21):4009-21.
44. Blasius M, Forment JV, Thakkar N, Wagner SA, Choudhary C, Jackson SP. A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biology*. 2011;12(8):R78.
45. Petermann E, Woodcock M, Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(37):16090-5.
46. Wilsker D, Petermann E, Helleday T, Bunz F. Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(52):20752-7.
47. Meuth M. Chk1 suppressed cell death. *Cell Div*. 2010;5:21-.
48. Rodriguez R, Meuth M. Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Molecular biology of the cell*. 2006;17(1):402-12.
49. Millar AH, Heazlewood JL, Giglione C, Holdsworth MJ, Bachmair A, Schulze WX. The Scope, Functions, and Dynamics of Posttranslational Protein Modifications. *Annu Rev Plant Biol*. 2019;70:119-51.
50. Lee TI, Young RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 2013;152(6):1237-51.
51. Corbett AH. Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;52:96-104.
52. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*. 2000;14(3):289-300.
53. Carroll BL, Pulkoski-Gross MJ, Hannun YA, Obeid LM. CHK1 regulates NF- $\kappa$ B signaling upon DNA damage in p53- deficient cells and associated tumor-derived microvesicles. *Oncotarget*. 2016;7(14):18159-70.

54. Goto H, Natsume T, Kanemaki MT, Kaito A, Wang S, Gabazza EC, et al. Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. *J Cell Sci.* 2019;132(2).
55. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
56. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):475-93.
57. Li P, Meng Y, Wang L, Di LJ. BioID: A Proximity-Dependent Labeling Approach in Proteomics Study. *Methods Mol Biol.* 2019;1871:143-51.
58. Kim HH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *Journal of nucleic acids.* 2010;2010:981487.
59. Beaujouis R, Ottoni E, Zhang X, Gagnon C, Hassine S, Mollet S, et al. The M-phase specific hyperphosphorylation of Stauf2 involved the cyclin-dependent kinase CDK1. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):25.
60. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene.* 2009;28(33):2925-39.
61. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 2002;347(20):1593-603.
62. Cookson MR. RNA-binding proteins implicated in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(1).
63. Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, Reumann K, Schwartz PE, Will H, et al. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene.* 2011;30(4):434-44.
64. Pereira B, Billaud M, Almeida R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer.* 2017;3(7):506-28.
65. Castello A, Fischer B, Hentze MW, Preiss T. RNA-binding proteins in Mendelian disease. *Trends Genet.* 2013;29(5):318-27.
66. Shortt J, Johnstone RW. Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
67. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006;444(7119):633-7.
68. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & development.* 1998;12(19):2997-3007.
69. Tu Z, Aird KM, Zhang R. RAS, cellular senescence and transformation: the BRCA1 DNA repair pathway at the crossroads. *Small GTPases.* 2012;3(3):163-7.
70. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology.* 2011;192(4):547-56.
71. Mittelman D, Wilson JH. The fractured genome of HeLa cells. *Genome biology.* 2013;14(4):111-.
72. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2(9):e71-e.

73. Parapuram SK, Chang B, Li L, Hartung RA, Chalam KV, Nair-Menon JU, et al. Differential effects of TGFbeta and vitreous on the transformation of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(12):5965-74.
74. Senturk S, Mumcuoglu M, Gursoy-Yuzugullu O, Cingoz B, Akcali KC, Ozturk M. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology.* 2010;52(3):966-74.
75. Tominaga K, Suzuki HI. TGF-beta Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20).
76. Davis AJ, Chen BPC, Chen DJ. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair (Amst).* 2014;17:21-9.
77. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018;293(27):10512-23.
78. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2017;18:610.
79. Paulsen RD, Soni DV, Wollman R, Hahn AT, Yee MC, Guan A, et al. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol Cell.* 2009;35(2):228-39.
80. Ferre F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction. *Brief Bioinform.* 2016;17(1):106-16.
81. Su M, Wang H, Wang W, Wang Y, Ouyang L, Pan C, et al. LncRNAs in DNA damage response and repair in cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018;50(5):433-9.
82. Lees-Miller SP, Beattie TL, Tainer JA. Noncoding RNA joins Ku and DNA-PKcs for DNA-break resistance in breast cancer. *Nature structural & molecular biology.* 2016;23(6):509-10.
83. Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. The Role of Long Non Coding RNAs in the Repair of DNA Double Strand Breaks. *Int J Mol Cell Med.* 2017;6(1):1-12.
84. García-Muse T, Aguilera A. Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2016;17:553.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 9. Decrease of STAU2 protein levels in response to CHK1 pathway inhibition.** (A-B) HCT116 cells were incubated in the presence of different CHK1 kinase inhibitors (iCHK1 20  $\mu$ M, PF47 20  $\mu$ M, and CHIR124 200 nM) for 8 hours. (C-D) hTert-RPE1 (RPE) cells were incubated in presence of the CHK1 inhibitor PF47 (20  $\mu$ M) for 8h. (E) HCT116 cells and (F) hTert-RPE1 cells were incubated in the presence of the CHK1 kinase inhibitors PF47 (15  $\mu$ M) for 6h. (A and C) Cell extracts were analyzed by western blotting. The western blots are representative of three independently performed experiments. The vehicle DMSO was used as control. PARP1 cleavage was used as a measure of apoptosis and  $\beta$ -actin as a loading control. (B and D) Quantification of STAU2 protein level for A and C (all isoforms). (E and F) STAU2 protein expression was analyzed by western blotting, while STAU2 mRNA levels were quantified by RT-qPCR. The vehicle DMSO was used as control. Protein quantification and RT-qPCR data represent the means and standard deviation of three independently performed experiments. The ratio of STAU2 (protein or mRNA) on actin (protein or mRNA, respectively) in DMSO-treated cells was fixed to 1. Statistical analyses: Student's *t*-test \*\*\**P*-value  $\leq$  0.001; \*\**P*-value  $\leq$  0.01; \**P*-value  $\leq$  0.05.

**Figure 10. STAU2 decrease observed in response to CHK1 inhibition involves caspase(s)** (A-B) HCT116 cells were incubated in the presence of the proteasome inhibitor MG132 (10  $\mu$ M) for 2 hours, then with MG132 (10  $\mu$ M) and the CHK1 kinase inhibitor iCHK1 (20  $\mu$ M) for an additional 8h. (iCHK1 and MG132 alone are used as control). (C-D) HCT116 cells were incubated in the presence of the lysosome inhibitor iLYS (10  $\mu$ M) for 2 hours, then with iLYS (10  $\mu$ M) and the CHK1 kinase inhibitor iCHK1 (20  $\mu$ M) for an additional 8h. (iCHK1 and iLYS alone are used as control). (E-F) HCT116 cells were simultaneously incubated in the presence of the pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK (50  $\mu$ M) and the CHK1 kinase inhibitor PF47 (20  $\mu$ M) for 8h. (PF47 and ZVAD alone are used as control). (G) HCT116 cells were incubated with the pan-caspase inhibitor

ZVAD-FMK (50 mM) for different times. **(H)** HCT116 were incubated in the presence of the pan-caspase inhibitor Emricasan (40  $\mu$ M) for 24h. (A, C, E, G and H) Cells were collected and analyzed by western blot. The western blots are representative of three independently performed experiments. The vehicle DMSO was used as control. Ubiquitin was used as a measure of proteasome inhibition. PARP1 was used as a measure of caspase inhibition and  $\beta$ -actin or GAPDH as a loading control. (B, D, and F) Quantification of STAU2 protein levels from A, C, and F. Protein quantification represents the means and standard deviation of three independently performed experiments. The ratio of STAU2 on actin or GAPDH in DMSO-treated cells was fixed to 1. Statistical analyses: Student's *t*-test \*\**P*-value  $\leq$  0.01; \**P*-value  $\leq$  0.05.

**Figure 11. STAU2 depletion triggers  $\gamma$ H2AX accumulation and downregulates several DDR proteins** **(A)** Schematic representation and sequence of STAU2 Exon 7 in a human genome (WT). The target sequence of the RNA guide used for CRISPR gene editing is underlined. The sequences of two different CRISPR/Cas9-derived STAU2-KO clones are shown below. Dashed lines indicate deleted nucleotides; the stop codons are indicated in red. **(B)** hTert-RPE1 STAU2-KO cells were analyzed by Western Blotting. The western blot is representative of three independently performed experiments.  $\beta$ -actin was used as a loading control. **(C)** Quantification of  $\gamma$ H2AX protein levels in four different hTert-RPE1 STAU2-KO cells. Protein quantification represents the means and standard deviation of three independently performed experiments. The ratio of  $\gamma$ H2AX on H2AX in wild type (WT) cells was arbitrary fixed to 1. Statistical analyses, Student's *t*-test: \*\**P*-value  $\leq$  0.01. **(D)** Two different hTert-RPE1 STAU2-KO clones were analyzed by RT-qPCR for the expression of several genes involved in DNA repair. The RT-qPCR data represent the means and standard deviation of three independently performed experiments. The ratio of specific gene mRNAs on actin mRNA in wild type (WT) cells was arbitrary fixed to 1. Statistical analyses, Student's *t*-test: \*\**P*-value  $\leq$  0.01; \**P*-value  $\leq$  0.05. MSH2, mutS homolog 2; MSH6, mutS homolog 6; BLM, Bloom syndrome protein;

FANCG, Fanconi anemia complementation group G; FANCD2, Fanconi anemia complementation group D2.

**Figure 12. STAU2 depletion promotes cell proliferation in hTert-RPE1 cells**

**(A)** Growth curves of STAU2-KO #1 and wild-type (WT) hTert-RPE1 cells. Cells were counted every day with an automated hemacytometer. The graph shows the means and standard deviation of three independently performed experiments. **(B)** Three STAU2-KO clones and control (WT) cells were plated at the same density. After ten days, a crystal violet retention assay was performed to evaluate cell proliferation. The relative growth of wild-type cells was arbitrary fixed to 1. The graph shows the means and standard deviation of three independently performed experiments. Statistical analyses: Student's *t*-test \*\*\**P*-value  $\leq 0.001$ ; \*\**P*-value  $\leq 0.01$ . **(C-D)** hTert-RPE1 (C) or HeLa cells (D) were infected with viruses expressing shRNA control (shNT) or shRNA against STAU2. After selection, cells were plated at the same density. After ten days, a crystal violet retention assay was performed to evaluate cell proliferation. The stain was extracted and quantified by measuring absorbance at 590 nm. The relative growth of wild-type cells was arbitrary fixed to 1. The graph shows the means and standard deviation of three independently performed experiments. **(E)** STAU2-KO and wild-type (WT) cells were grown asynchronously or were synchronized at the G<sub>1</sub>/S transition using a double block thymidine treatment (DTB). At different time points post-release (3h or 5h), cells were harvested and analyzed by FACS to determine the percent of cells in each phase of the cell cycle. **(F)** STAU2-KO cells and wild-type cells were infected with viruses expressing STAU2<sup>52</sup>-FLAG<sub>3</sub>. 24h post-selection, cells were synchronized at the G<sub>1</sub>/S transition using a double block thymidine treatment (DTB). Block was followed by a release of 5 h in fresh medium, and cells were analyzed by FACS to determine the percent of cells in each phase of the cell cycle.

**Figure 13: STAU2 downregulation induces senescence in the untransformed IMR90 cells.** (A-E) IMR90 cells were infected with viruses expressing shRNA control (shNT) or with shRNA targeting all isoforms of STAU2 (shSTAU2). (A) The relative growth was followed for seven days post-infection using crystal violet retention assay. (n=3) (B) SA- $\beta$ -gal staining of IMR90 cells expressing shRNA control or shRNA against STAU2 (9 days post-infection). (C) Quantification of SA- $\beta$ -gal-positive cells. (A-C) The graph shows the means and standard deviation of two independently performed experiments. (D, E) Expression of different genes involved in the cell cycle or DDR pathway was analyzed by RT-qPCR 9 days after infection. The RT-qPCR data represent the means and standard deviation of three independently performed experiments. The ratio of specific gene mRNA on actin mRNA in control cells was fixed to 1. Statistical analyses, Student's *t*-test: \**P*-value  $\leq$  0.05.

**Figure 14. Identification of DDR proteins among STAU2 interactome (A-E)** hTert-RPE1 cells were infected with viruses expressing an empty vector or STAU2<sup>52</sup>-BioID2-HA. (A) Two days after selection, cells were incubated without (-) or with 50  $\mu$ M of Biotin (+) for 16 hours. Cell extracts were analyzed by Western blotting. (B) Immunofluorescence of STAU2 expression in control (empty vector), STAU2<sup>52</sup>-Myc<sub>3</sub> and STAU2<sup>52</sup>-BioID2-HA infected cells using anti-Myc and anti-HA antibodies. DAPI was used to stain the nucleus. (C) Heat map representing the average spectral counts of STAU2 interactors involved in the DDR pathway. Interactors were identified by AP-MS. Proteins were clustered using PANTHER GO-slim biological processes. (D) Schematic representation of STAU2 partners. (E) List of STAU2 interaction partners involved in the DDR pathway. Proteins were organized into pathways using gene ontology analysis. DSB: Double-strand breaks repair; HR: Homologous recombination; NHEJ: nonhomologous end joining; NER: nucleotide excision repair; BER: base excision repair; MMR mismatch repair. Proteins involved in the repair process are in blue. Proteins involved in the cellular response to DNA damage are in red. Proteins known to be related to the CHK1 pathway are in green.

**Figure S1. Prolonged treatment with different CHK1 kinase inhibitors induces a similar downregulation of STAU2. (A-D)** HCT116 cells were incubated in the presence of different CHK1 kinase inhibitors. (A) PF47 1  $\mu$ M for 48h, (B) CHIR124 200 nM for 48h. (E-F) hTert-RPE1 (RPE) cells were incubated in the presence of the CHK1 inhibitor PF47 (1  $\mu$ M) for 48h. (A, C and E) STAU2 protein expression was analyzed by western blotting. The western blots are representative of three independently performed experiments. The vehicle DMSO was used as control.  $\beta$ -actin was used as a loading control. (B, D, and F) Quantification of STAU2 protein levels for A, C, and E (all isoforms). The protein quantifications represent the means of three independently performed experiments. The ratio of STAU2 on actin in DMSO-treated cells was fixed to 1.

**Figure S2. Downregulation of CHK1 by siRNA induces a decrease of STAU2 protein levels (A-B)** HCT116 cells were transfected with siRNA control (siNT) or siRNA against CHK1 (siCHK1). **(C-D)** hTert-RPE1 (RPE) cells were transfected with siRNA control (siNT) or siRNA against CHK1 (siCHK1). 24h post-transfection, cells were collected and analyzed by western blotting (A-C). The western blots are representative of three independently performed experiments.  $\beta$ -actin was used as a loading control. (B-D) Quantification of STAU2 (all isoforms) and CHK1 protein levels from A and C. Protein quantification represents the means and standard deviation of three independently performed experiments. The ratio of specific protein on actin in siNT-transfected cells was fixed to 1. Statistical analyses: Student's *t*-test \**P*-value  $\leq$  0.05.

**Figure S3. STAU2 is cleaved in a caspase-dependent manner (A)** HCT116 cells were transfected a plasmid coding for STAU2<sup>59</sup>-Flag<sub>3</sub>. Cells were then incubated in the presence of DMSO (-) or of the caspase inhibitor Emricasan (40  $\mu$ M) (+) for 24h. Cells were collected and analyzed by Western blotting. The western blot is representative of two independently performed experiments. PARP1 was used as a measure of caspase



inhibition and  $\beta$ -actin as a loading control. **(B)** Schematic representation of STAU2 caspase cleavage sites.

**Figure S4. Knockout of STAU2 in the un-transformed hTert-RPE1 cell line by the CRISPR/Cas9 technique.** **(A)** hTert-RPE1 cells were transfected with plasmids expressing Cas9/sgRNA complex targeting exon 7 of the *STAU2* gene. Colonies grown from single cells were screened for STAU2 protein expression by Dot blotting. **(B)** Six different STAU2-KO clones were analyzed by RT-qPCR for STAU2 expression. The ratio of STAU2 mRNAs on actin mRNA in wild type (WT) cells was arbitrary fixed to 1. (F4, F4, G4, F6, E4 are positive clones; I2: is a negative clone)

**Figure S5: ST2 downregulation induces senescence in IMR90 cells with a second shRNA (A-B)** IMR90 cells were infected with viruses expressing shRNA control (shNT) or shRNA targeting all isoforms of STAU2 (shSTAU2). **(A)** The relative growth was followed for seven days post-infection using crystal violet retention assay. **(B)** SA- $\beta$ -gal staining of IMR90 cells expressing shRNA control or shRNA against STAU2 (9 days post-infection).

# FIGURES

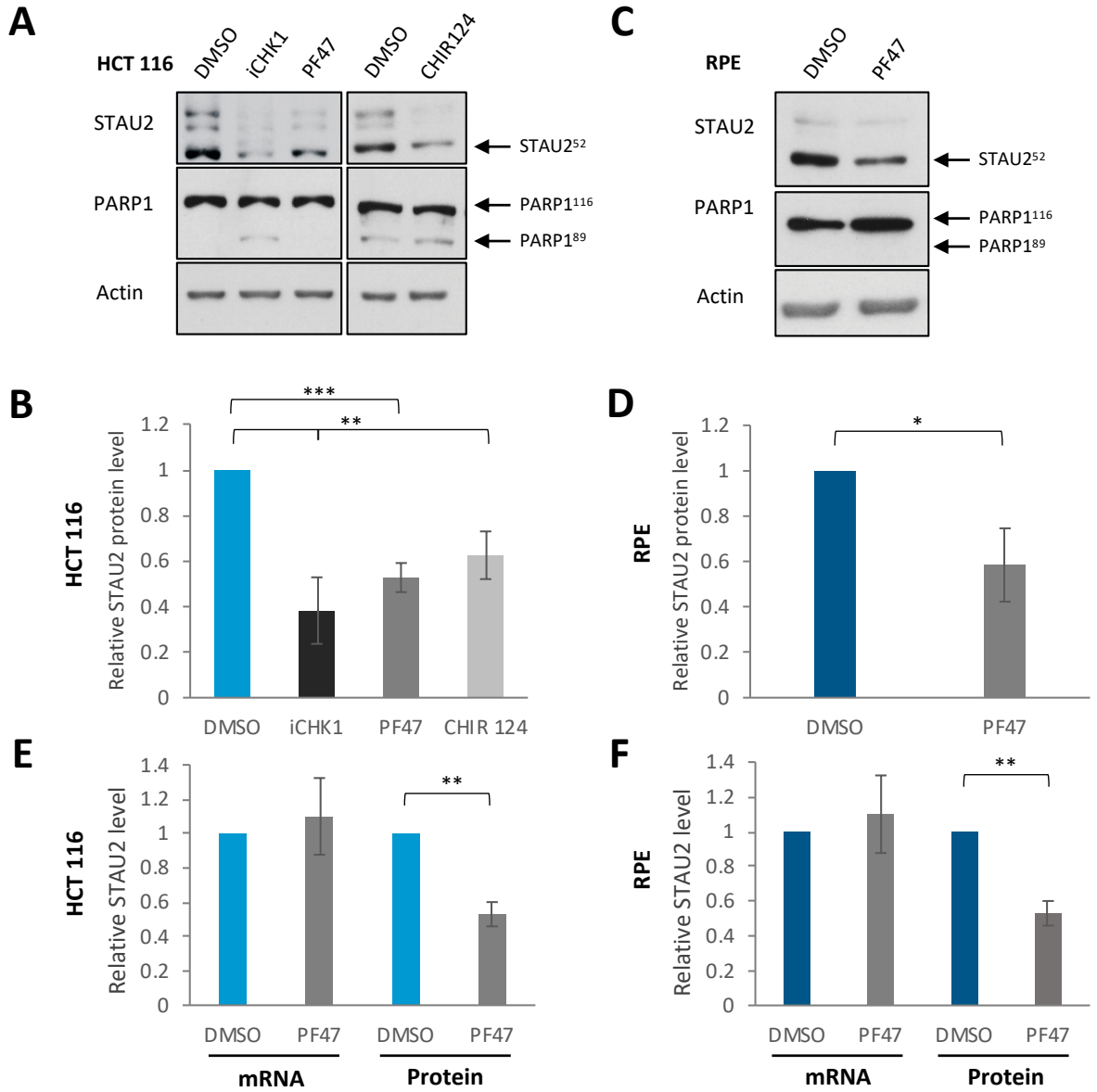


Figure 9.

**Figure 9.- Decrease of STAU2 protein levels in response to CHK1 pathway inhibition**

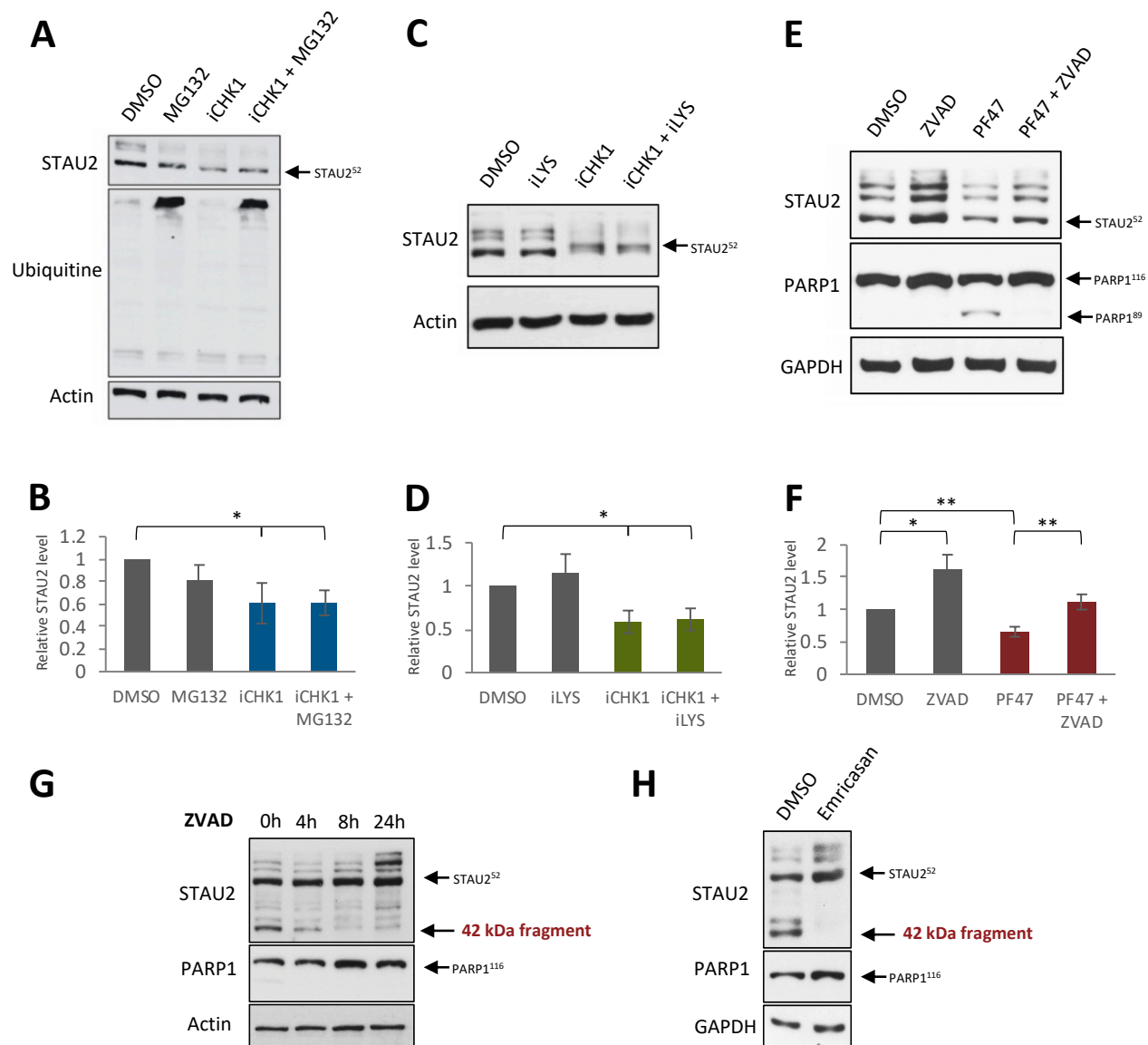


Figure 10. -

**Figure 10.- STAU2 decrease observed in response to CHK1 inhibition involves caspase(s)**

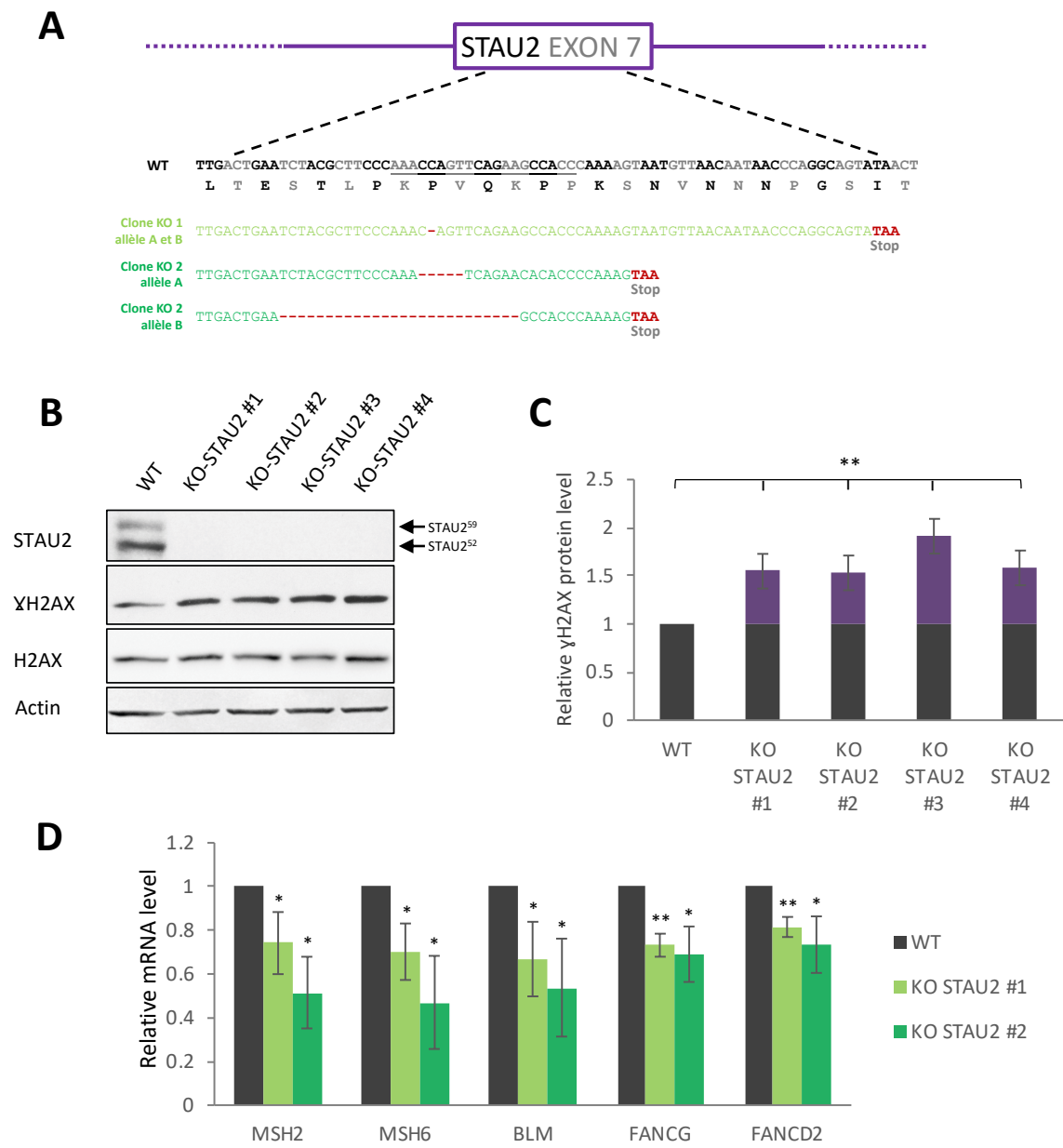


Figure 11.-

**Figure 11.- STAU2 depletion triggers DNA-damage and downregulates several DDR proteins**

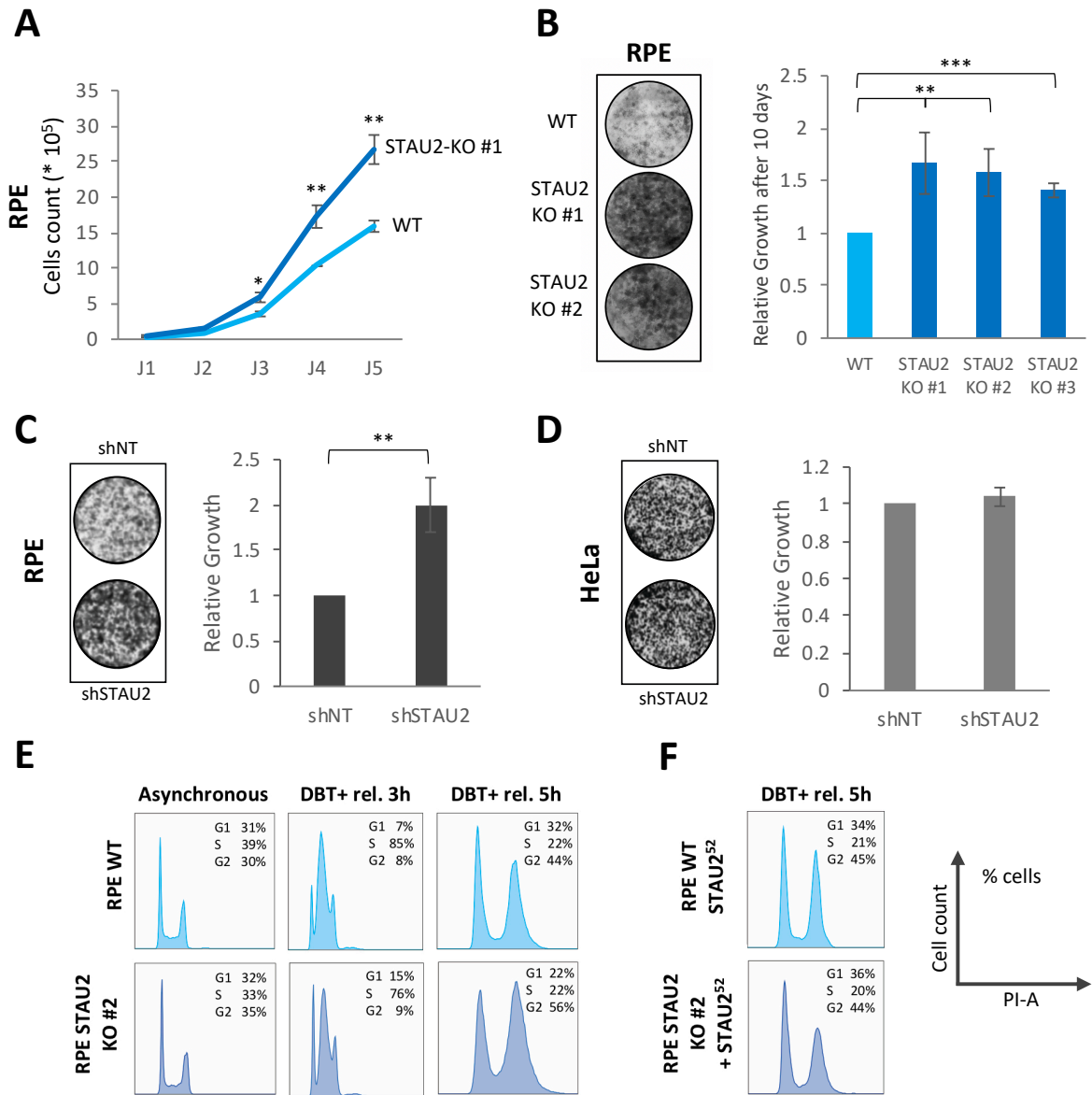


Figure 12.-

**Figure 12.- STAU2 depletion promotes cell proliferation in hTert-RPE1 cells**

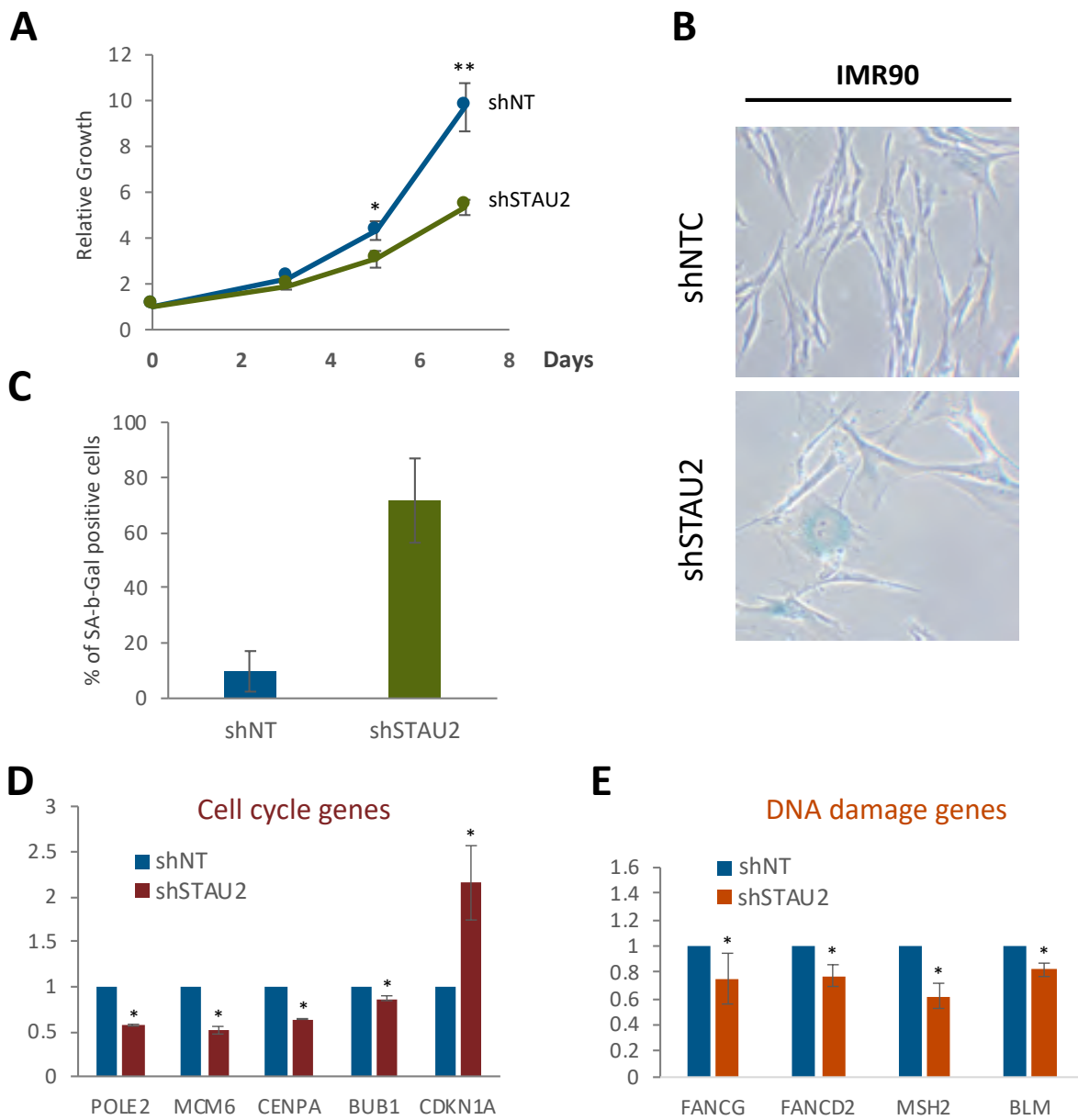


Figure 13. -

**Figure 13.- STAU2 downregulation induces senescence in the untransformed IMR90 cells**

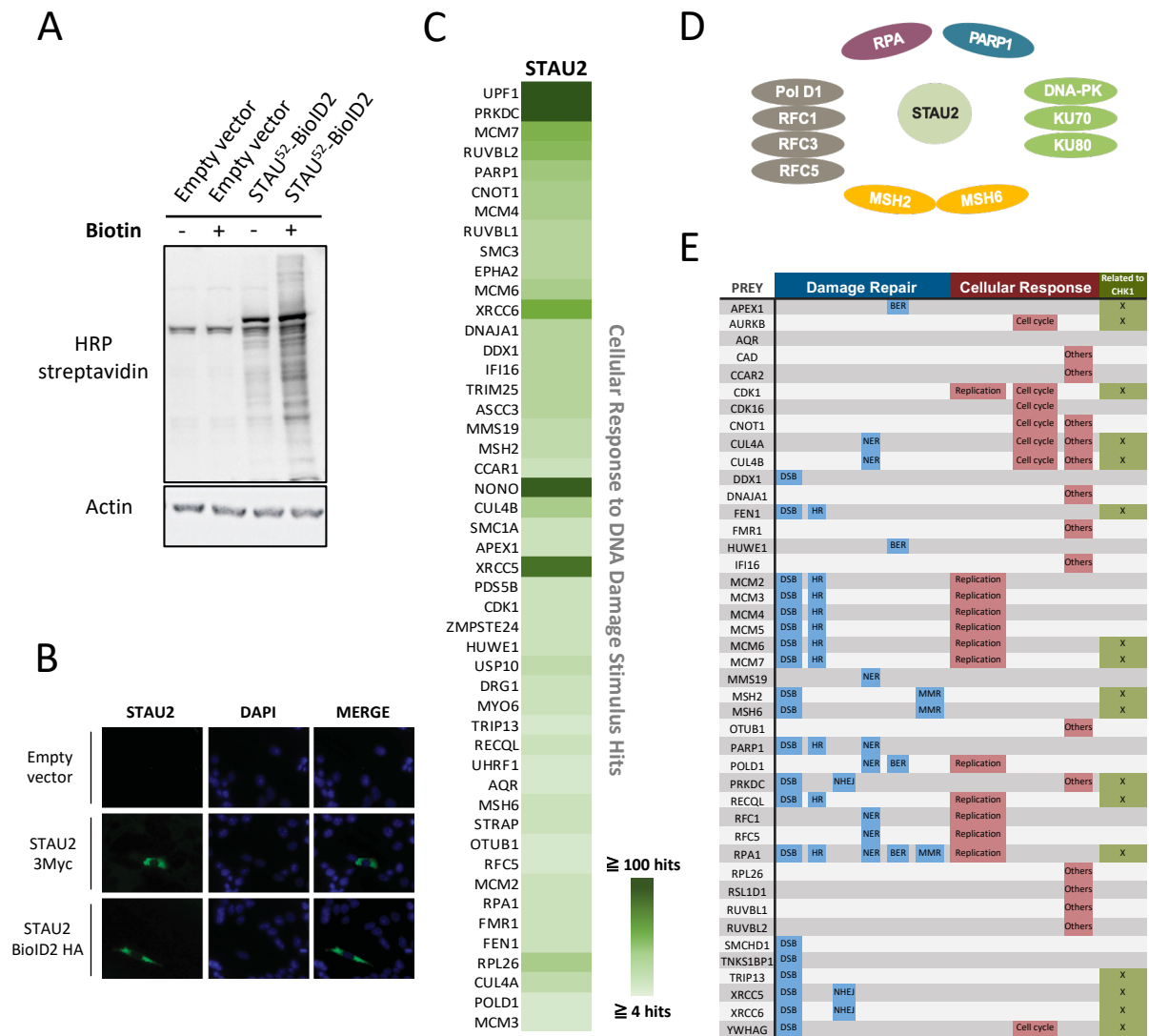


Figure 14.

**Figure 14.- Identification of DDR proteins among STAU2 interactome**

## SUPPLEMENTARY DATA

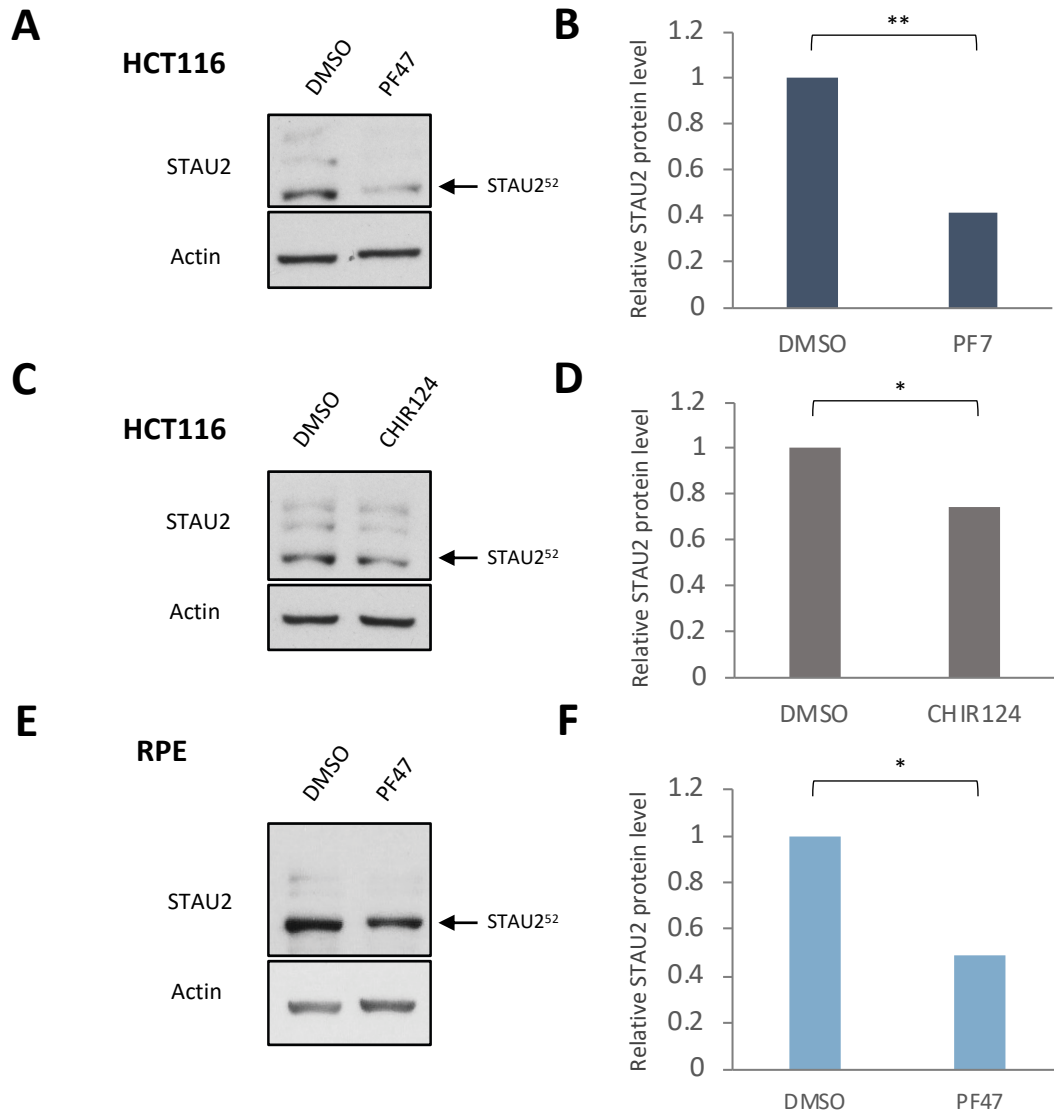


Figure S1.-

**Figure S1.- Prolonged treatment with different CHK1 kinase inhibitors induces a similar downregulation of STAU2**



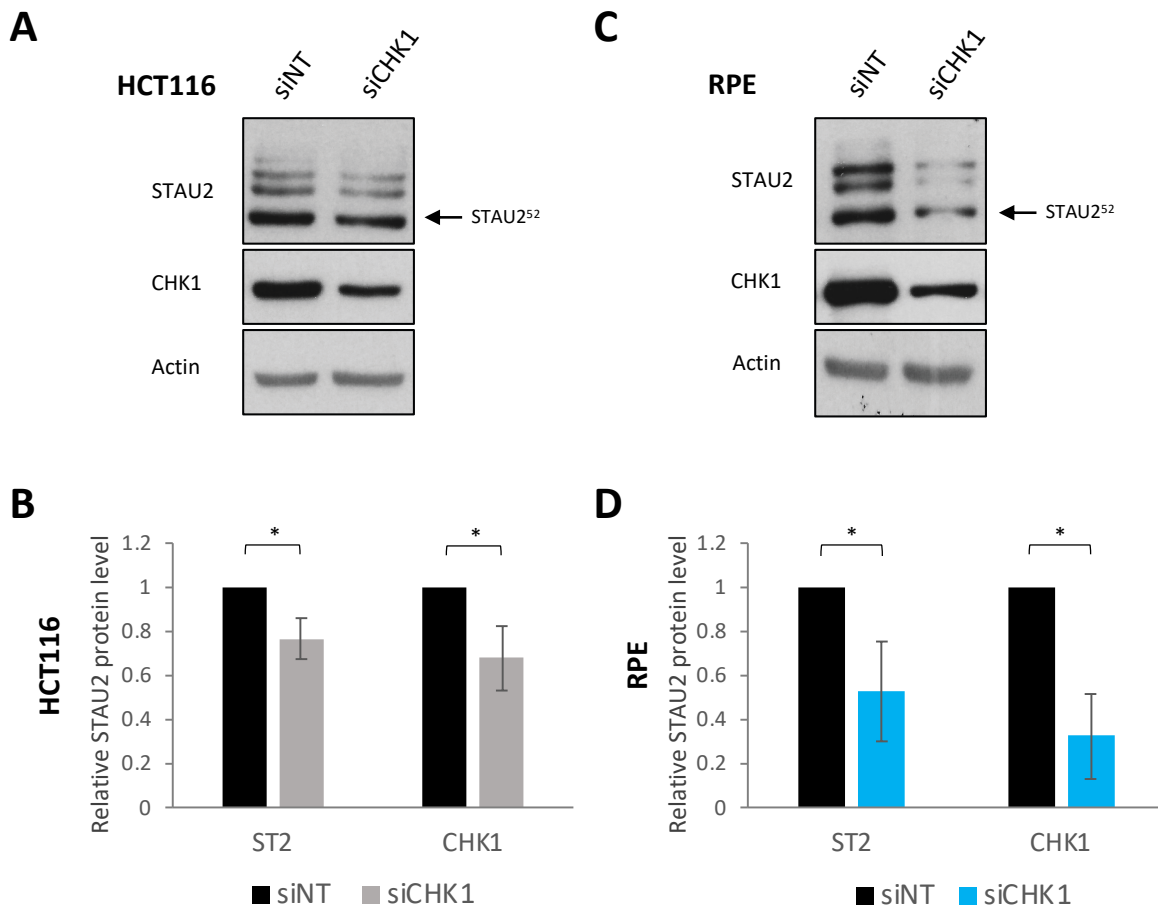


Figure 16.

**Figure S2.- Downregulation of CHK1 by siRNA induces a decrease of STAU2**

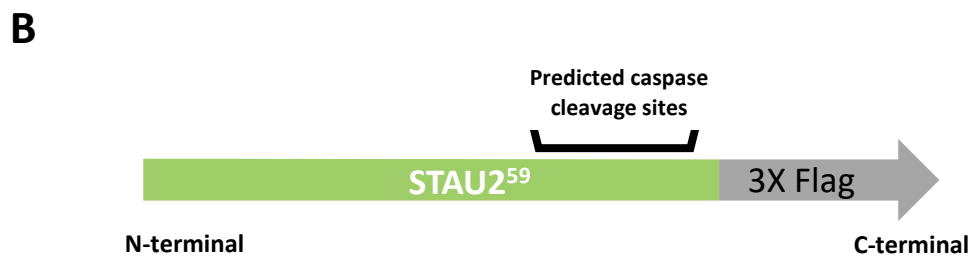
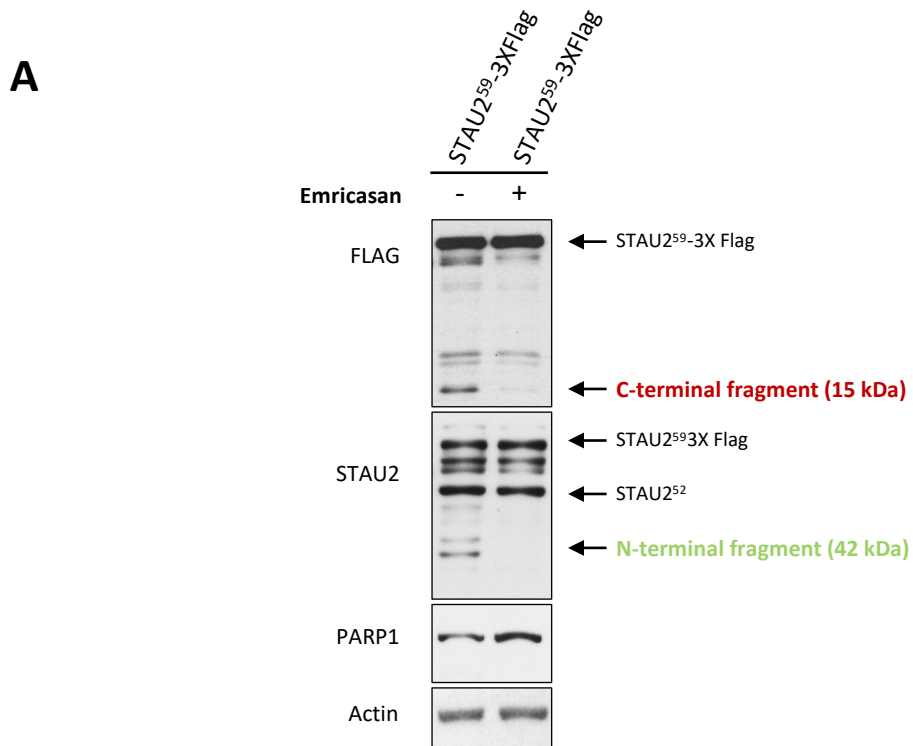
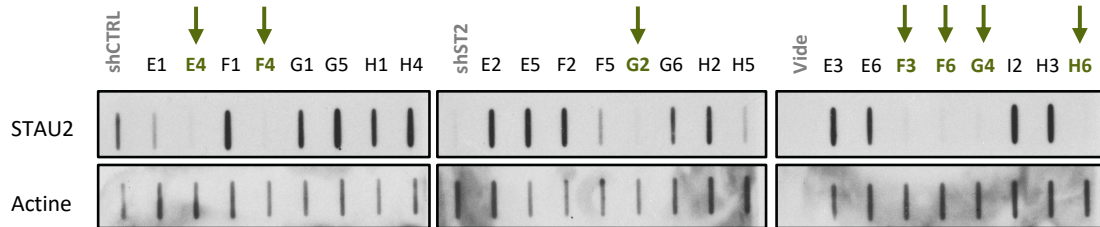


Figure 17.

**Figure S3.- STAU2 is cleaved in a caspase-dependent manner**

**A**



**B**

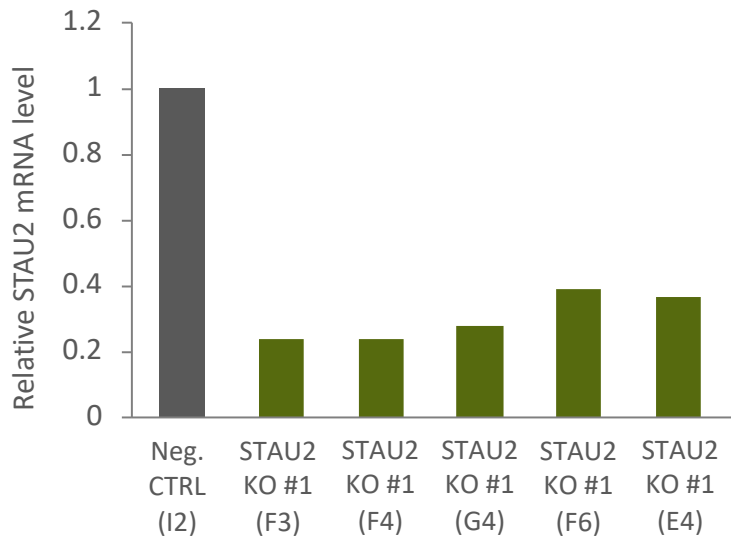
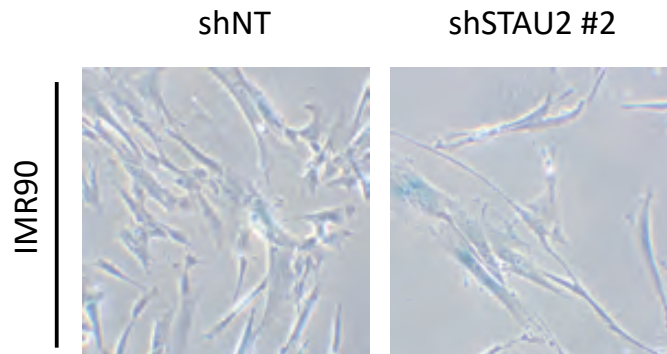


Figure 18.

**Figure S4.- Knockout of STAU2 in the un-transformed hTert-RPE1 cell line by CRISPR/Cas9**

**A**



**B**

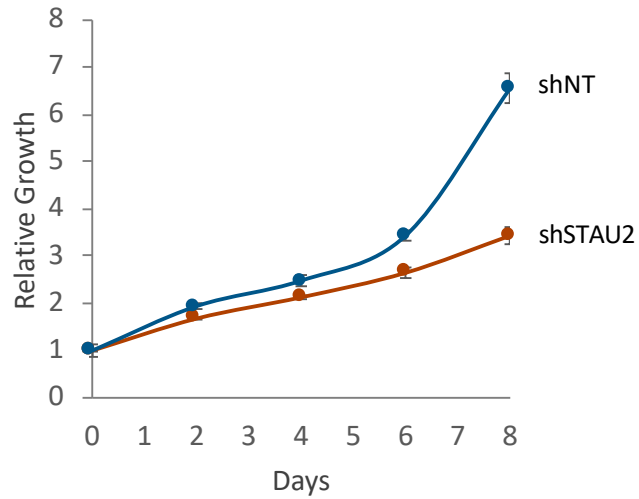


Figure 19.1

**Figure S5.- ST2 downregulation induces senescence in IMR90 cells with a second shRNA**

## SUPPLEMENTARY TABLE SI : Oligonucleotide sequences

	Olinucleotide sequence Forward (5'=>3')	Olinucleotide sequence RV (5'=>3')
<b>qPCR primers</b>		
MSH2	5'-CAAGGAGAATGATTGGTATTTGG-3'	5'-CCAAAGAGAATGTCTTCAAACCTGAG-3'
MSH6	5'-TGAATTGGCAGTTTGTGATGA-3'	5'-TCTGTTACGTAAGTTGTGCCTACC-3'
FANCD2	5'-AGCACACTGGCATTTAGCAA-3'	CACCAAGTGCATGTCATCCT-3'
FANCG	5'-CCTGGCCTTGTACTAGAGACC-3'	5'-AGTTTTCAGAAGTAACAGCAGATCC-3'
BLM	5'-GGATCAGAAAGCACCCACATA-3'	5'-TCAGCCATGGTGTACATTC-3'
POLE2	5'-GGATCCTGGATTTGGTTCCATC-3'	5'-TGTGTACAGTACTGAATTCTGCAAGGA-3'
MCM6	5'-CAGCTAAGAGCCAATTTCTCAAG-3'	5'-GGACGCTTTACCACTGGTGT-3'
CENPA	5'-AATGGATTCTGCGATGCTGTCTGG-3'	5'-TTTTCAGGCCTTTGGAACGGTGT-3'
BUB1	5'-CAGTCAGACTCTCAGCATCAAGA-3'	5'-CGAGGCAGAAGAACCAGAGA-3'
CDKN1A	5'-ACCCTTGTGCCTCGCTCAGG-3'	5'-GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTGT-3'
ST2	5'-GCTCTGAAGCGAAATATGCCTGTC-3'	5'-TTTAAGCTCCTGTAAGACGGTGGTCG-3'
Actine	5'-GTTCAAA TGTGGCCGAGGACTTT-3'	5'-TTAGGATGGCAAGGGACTTCCTGT-3'
<b>Sequencing primers</b>		
Characterization RPE STAU2-KO	5'-AGCAGAATCTTGGATAGGATAGAACAGAATTGG-3'	5'-ATTAGGATCCACACACATAGCAGACAACATAAC-3'
<b>Cloning primers</b>		
pMSCVpuro-STAU2 <sup>52</sup> -BioID-HA STEP #1	5'-TAAGCAGCTAGCATGCTTCAAATAAATCAGATGTTCT-3'	5'-TGCTTAACCGGTCTACCTGAAAGCCTTGAATCCT-3'
pMSCVpuro-STAU2 <sup>52</sup> -BioID-HA STEP #2	5'-GCTAGCATGCTTCAAATAAAT-3'	5'-GTTTAAACTTAAGCTTCTATGCG
shSTAU2 #2	5'-GGATCCCCAAAGATATGAACCAACCTTCAAGAGAGGT TGGTTCATATCTTTGGGTTTTTGGAAAGCTT-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAACCCAAAGATATGAACCAACCTC TCTTGAAGTTGGTTCATATCTTTGGGG-3'



## Discussion

Les cellules sont perpétuellement exposées à des agents induisant des dommages à l'ADN. L'accumulation de dommages à l'ADN est à l'origine d'instabilité génomique et peut à terme conduire à des pathologies hyper-prolifératives telles que le cancer. Afin de favoriser leur survie, les cellules ont développé au cours du temps différents mécanismes permettant de répondre aux dommages à l'ADN. Ces voies couramment appelées DDR (*DNA damage response*) permettent de prendre en charge les dommages à l'ADN et ainsi de diminuer leur impact potentiel (3). Parmi les réponses cellulaires rapides, on retrouve entre autres l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de mécanismes de réparation (51). Dans le cas où les dommages ne peuvent pas être réparés, les cellules enclenchent des processus tels que la sénescence cellulaire ou l'apoptose afin d'éviter de propager les dommages aux cellules filles pendant la mitose (256, 433). Le DDR est composé d'un réseau de protéines de signalisation et de régulation incluant également des protéines de liaison à l'ARN (379). Les RBP sont des régulateurs majeurs du contrôle post transcriptionnel de l'expression des gènes. Elles sont impliquées dans d'innombrables processus cellulaires via la régulation du devenir des ARNm qu'elles lient. En outre, RBP sont elles-mêmes hautement régulées afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (334).

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine de liaison à l'ARN STAU2 dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN. Les résultats présentés mettent également de l'avant un tout nouveau rôle de STAU2 dans le contrôle du cycle cellulaire. D'une part, nous avons montré que STAU2 est essentielle pour maintenir une prolifération cellulaire normale dans les cellules épithéliales hTert-RPE1. La déplétion de STAU2 dans cette lignée cellulaire est à l'origine d'une hyper-prolifération et favorise l'accumulation de dommages à l'ADN. D'autre part, nous avons rapporté que la déplétion de STAU2 dans les cellules IMR90 induit plutôt un arrêt de prolifération concomitant à une entrée des cellules en sénescence. En outre nous avons montré que la stabilité de STAU2 est régulée par la kinase centrale des voies du DDR, CHK1. Une inhibition de celle-ci induit la dégradation de STAU2 par les caspases.

## **La voie de la kinase CHK1 contrôle la stabilité de STAU2**

La kinase CHK1 s'impose comme un régulateur cellulaire majeur (74). En plus de jouer un rôle central dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN, CHK1 est impliquée en l'absence de dommage dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la stabilisation de la phase S (80, 83). Afin de mener à bien ses fonctions, CHK1 contrôle un grand nombre d'effecteurs. La régulation de ces effecteurs implique le plus souvent des réactions de phosphorylation (73). La voie CHK1 contrôle de très nombreuses protéines cellulaires, parmi elles se trouvent également des protéines de liaison à l'ARN. C'est par exemple le cas de la protéine HuR dont la localisation est modulée en présence de dommages par un mécanisme dépendant de la kinase CHK1 (359). Les protéines de liaison à l'ARN sont des régulateurs majeurs du contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes. Elles sont en mesure de réguler simultanément le devenir des ARNm d'une même voie cellulaire ayant ainsi un impact concerté dans le contrôle de certains processus (341, 377, 434).

Ici, nous avons rapporté que l'inhibition de la kinase CHK1 en l'absence de dommage à l'ADN conduit à la dégradation rapide de la protéine STAU2 par les caspases. Ce mécanisme représente ainsi un tout nouveau mode de régulation de STAU2. Cette observation sous-entend que la kinase CHK1 est nécessaire pour maintenir le niveau cellulaire de STAU2 en l'absence de dommages à l'ADN. Ainsi, nos travaux montrent que CHK1 est en mesure de réguler la stabilité d'une nouvelle protéine de liaison à l'ARN en empêchant sa dégradation.

Nous avons pris un soin particulier à confirmer que la diminution de STAU2 observée était bien due à l'inhibition spécifique de la kinase CHK1 et non pas à l'inhibition d'une cible secondaire. Par exemple, les kinases CHK1 et CHK2 partagent un certain nombre de caractéristiques structurales communes, ce qui favorise leur inhibition par les mêmes agents pharmacologiques (54). Afin d'éviter tout doute, nous avons confirmé l'effet de l'inhibition de CHK1 sur STAU2 avec trois inhibiteurs différents. Un de ces inhibiteurs (PF47) a une affinité 100 fois plus grande pour CHK1 que pour CHK2 (435). Parallèlement, nous avons également montré que la diminution du niveau d'expression de CHK1 à l'aide



de siRNA avait un effet semblable sur le niveau d'expression de STAU2. Cela permet de confirmer que c'est bien l'inhibition spécifique de CHK1 qui est à l'origine de l'effet observé.

Contrairement à la voie ATM/CHK2, la voie ATR/CHK1 est essentielle à la survie cellulaire. Cela s'explique en grande partie par le rôle de ces kinases dans le contrôle du cycle cellulaire en l'absence de dommages à l'ADN (82, 83, 436, 437). Il a été montré à plusieurs reprises que la déplétion de CHK1 induit une augmentation du stress réplicatif et qu'elle favorise l'entrée des cellules en apoptose (438). Dès lors, on comprend qu'il était primordial pour nous de s'assurer que la diminution de STAU2 en réponse à l'inhibition de CHK1 n'était pas une simple conséquence de l'entrée des cellules en apoptose. Pour cela, nous avons suivi le niveau de PARP1 au fil de nos différentes expériences. La protéine PARP1 est connue pour être clivée par la caspase 3 lorsque l'apoptose est déclenchée, elle peut ainsi être utilisée afin de surveiller l'entrée des cellules en apoptose (439). De façon rassurante, nos résultats ont montré que STAU2 était diminuée en réponse à l'inhibition de CHK1 sans clivage notable de PARP1. De plus, nous avons également inhibé CHK1 avec des doses très faibles d'inhibiteur pendant de plus longues périodes. Dans ces conditions nous avons observé une diminution de STAU2 alors que les cellules continuaient de proliférer et ne montraient pas de signes de mort cellulaire. Cela indique ainsi que c'est bel et bien l'inhibition de CHK1 qui est responsable de l'effet observé indépendamment de l'induction de l'apoptose.

Nos travaux rapportent que la diminution de STAU2 en réponse à l'inhibition de la voie CHK1 n'a pas lieu au niveau transcriptionnel. La vérification de ce point était particulièrement importante dans la mesure où CHK1 peut dans certains cas contrôler la transcription des gènes. D'une part, l'activation de la kinase CHK1 dans un contexte de dommage à l'ADN peut aboutir à l'activation du facteur de transcription p53 qui à son tour régule l'expression de très nombreux gènes cibles (78, 177). Nous n'avons pas fait de cette possibilité une priorité car il n'a jamais été montré que STAU2 était régulée par le facteur de transcription p53. En revanche, il a été rapporté que CHK1 régule l'expression de plusieurs gènes via le contrôle de répresseurs de transcription (440).

C'est par exemple le cas de la protéine E2F6 qui inhibe l'expression des gènes médiée par les facteurs de transcription de la famille E2F (441). Sous certaines conditions, CHK1 phosphoryle E2F6 afin d'annuler son action de répression habituelle et ainsi permettre l'expression des gènes normalement réprimés (442). À partir de ces informations, on peut facilement émettre l'hypothèse qu'en l'absence de CHK1 de tels répresseurs ne sont plus inactivés et répriment continuellement l'expression de certains gènes. Cela pourrait expliquer la baisse d'expression de STAU2 observée. La vérification de ce point était d'autant plus importante que notre laboratoire a récemment montré que l'expression de STAU2 était régulée par le facteur de transcription E2F1 en présence ou non de dommages à l'ADN (392). Nous avons écarté la possibilité d'une régulation transcriptionnelle de STAU2 en réponse à l'inhibition de CHK1 en suivant l'évolution des niveaux d'ARN messager et de protéine de STAU2 au cours du temps. Nous avons démontré que lorsque la kinase CHK1 est inhibée par un agent pharmacologique, la diminution de STAU2 apparaît dès 2 h de traitement alors que l'ARN messager reste constant pendant au moins 6 h. Ce temps est largement inférieur à la demi-vie de STAU2. De plus, nous avons écarté la possibilité d'une diminution globale de la traduction puisque le niveau d'expression d'autres protéines avec une demi-vie similaire n'est pas affecté dans ces mêmes conditions. C'est par exemple le cas de STAU1, le paralogue de STAU2 (donnée non montrée). Ces différentes évidences nous ont permis de conclure que la diminution de STAU2 en réponse à l'inhibition de CHK1 avait lieu au niveau post-traductionnel. Dans une précédente publication, notre laboratoire a rapporté que l'induction de bris simple brin à l'ADN par l'exposition aux UV ou à des agents chimiques induit dans les cellules HCT116 et hTert-RPE1 une diminution de STAU2 par un mécanisme purement transcriptionnel (392). Les résultats que nous venons de rapporter sont donc d'autant plus intéressants qu'ils nous permettent de conclure que la diminution de STAU2 observée en réponse à l'inhibition de CHK1 n'a rien en commun avec la diminution de STAU2 observée en réponse à l'induction de bris simple.

La diminution de STAU2 en réponse à l'inhibition de CHK1 étant post-traductionnelle, nous avons rapidement soupçonné l'implication d'un mécanisme de dégradation actif. Cette hypothèse était totalement en accord avec le fait que les voies de réponse aux

dommages à l'ADN sont régulées à de nombreux niveaux incluant souvent des mécanismes de dégradation (443, 444). De façon très intéressante, il a tout récemment été rapporté que le maintien du niveau basal de CHK1 était nécessaire afin d'éviter sa propre dégradation protéasomale (445). Nous avons successivement testé différentes voies de dégradation courantes des protéines. Dans un premier temps, nous avons étudié l'hypothèse d'une dégradation protéasomale de STAU2 en réponse à l'inhibition de CHK1. La voie de dégradation protéasomale est très couramment impliquée dans la dégradation de cibles des voies du DDR; c'est par exemple le cas du facteur de transcription p53 (446, 447). De façon intéressante, nous avons observé que même en présence d'un inhibiteur du protéasome, l'inhibition de CHK1 continuait à induire la dégradation de STAU2. De façon parallèle, nous avons confirmé l'inhibition du protéasome par le suivi de la stabilisation de diverses protéines ubiquitinyliées. Nous avons ainsi conclu que la dégradation de STAU2 dépendante de CHK1 n'impliquait pas la voie du protéasome. Nous avons ensuite testé l'hypothèse d'une dégradation lysosomale de STAU2. En effet, les protéines sont parfois recrutées au lysosome pour y être dégradées par des protéases (448). Tout comme dans le cas du protéasome, nous avons montré que l'inhibition de CHK1 en présence d'un inhibiteur du lysosome continuait à induire la dégradation de STAU2. De précédents résultats de notre laboratoire ont suggéré que STAU2 pourrait avoir un rôle anti-apoptotique et que sa déplétion favorisait l'entrée des cellules en apoptose (392). Nous nous sommes alors demandé si STAU2 pourrait être la cible des caspases qui sont des protéases majeures de l'apoptose (265, 279). Nous avons donc réalisé une inhibition simultanée de la kinase CHK1 et des pan-caspases. De façon surprenante, nous avons observé que, dans ce cas, STAU2 était protégée et ne diminuait plus à la suite de l'inhibition de CHK1. Cela démontrait que la dégradation de STAU2 induit par l'inhibition de CHK1 dépendait de la voie des caspases.

À partir du moment où nous avons compris que la kinase CHK1 protégeait STAU2 d'une dégradation par les caspases, nous avons tenté de comprendre plus en détail ce mécanisme. Chez les eucaryotes, la stabilité des protéines est très fréquemment régulée par des modifications post-traductionnelles (449). CHK1 étant une kinase, l'hypothèse la

plus évidente était que CHK1 garantissait la stabilité de STAU2 par une phosphorylation protectrice. Cette hypothèse était appuyée par le fait que STAU2 possède deux sites consensus de phosphorylation reconnu par CHK1. On retrouve par ailleurs dans la littérature plusieurs exemples où des phosphorylations médiées par CHK1 régulent positivement ou négativement la stabilité de protéines (450, 451). Nous avons réalisé des essais de phosphorylation de STAU2 par CHK1 *in vitro*; malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de démontrer l'existence d'une phosphorylation directe (résultat non montré). L'échec de cette expérience est directement lié aux difficultés que nous avons rencontrées pour purifier la protéine STAU2, en effet celle-ci précipite dans des conditions permettant de réaliser un essai de phosphorylation *in vitro*. Cette étape devra être optimisée dans le futur afin de pouvoir déterminer clairement si CHK1 est en mesure de phosphoryler STAU2, et dans un second temps, si cette hypothétique phosphorylation joue un quelconque rôle sur la stabilité de STAU2. Une façon simple de remédier à cette difficulté serait de purifier différents fragments de STAU2 séparément. Jusqu'à présent, très peu d'études ont visé à découvrir les partenaires d'interaction de STAU2. Nous avons alors décidé de tenter de les identifier par spectrométrie de masse dans l'espoir de retrouver parmi eux la kinase CHK1 ou un de ses effecteurs directs. Pour cela, nous avons utilisé la technique BioID. Cette méthode vise à coupler une biotinylyase à une protéine d'intérêt. Cette construction est ensuite exprimée dans des cellules et tous les interactants dans un rayon d'environ 10 nm de la protéine de fusion seront biotinylés. Ceux-ci sont ensuite récupérés par *pull-down* avec des billes couplées à la streptavidine puis analysés par spectrométrie de masse. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle permet d'identifier des interactions rapides et faibles ce qui est souvent le cas avec les kinases (452). Nous avons analysé nos résultats à l'aide du site CRAPOME afin de soustraire les interactants de la biotinylyase et de ne garder que ceux de notre protéine d'intérêt (453). Il est toutefois important de noter que la base de données CRAPOME ne contenait pas de données spécifiques à notre type cellulaire ce qui nous a contraints à utiliser une combinaison d'informations provenant de diverses autres lignées cellulaires. Grâce à cette analyse, nous avons pu identifier un grand nombre d'interactants potentiels de STAU2. La kinase CHK1 ne se trouvait pas parmi

eux. Cependant de façon prometteuse, nous avons identifié plusieurs effecteurs directs de CHK1 laissant penser que la régulation de stabilité de STAU2 pourrait avoir lieu via un de ces effecteurs.

Afin de mieux comprendre comment la voie CHK1 pourrait contrôler la stabilité de STAU2, nous nous sommes intéressés en détail aux effecteurs de CHK1 retrouvés dans notre analyse protéomique. Parmi eux, nous avons identifié les protéines régulatrices CDK1 et Aurora B. Cette observation était d'autant plus intéressante qu'une étude antérieure réalisée par notre laboratoire suggérait que STAU2 pourrait être un substrat de la kinase CDK1. CHK1 contrôle le point de contrôle G<sub>2</sub>/M, notamment en inhibant l'activité de CDK1 par l'intermédiaire de CDC25A. En l'absence de CHK1, ce point de contrôle n'est plus régulé. Ainsi nous pouvons imaginer que la régulation de STAU2 par la voie CHK1 soit médiée par CDK1. De façon intéressante, ça ne serait pas le premier exemple où une RBP impliquée dans le DDR serait régulée par l'intermédiaire de CDK1. En effet, il a été montré qu'en présence de dommages à l'ADN, CHK1 régule la RBP HuR par l'intermédiaire de CDK1 (359).

Étant donné que nous n'avons pas pu clairement identifier si c'était la kinase CHK1 elle-même ou un de ses proches effecteurs qui était responsable du maintien de la stabilité de STAU2, nous pensons que la prochaine étape du projet devra en priorité répondre à cette question. Pour cela, nous proposons d'inhiber pharmacologiquement ou à l'aide de RNAi, les différentes cibles de CHK1 obtenues dans notre expérience de BioID. Nous pourrions ainsi déterminer si leur disparition a un impact sur STAU2. Certaines de ces cibles étant normalement réprimées par CHK1, leur surexpression devra aussi être testée. De plus, la localisation des RBP est une partie primordiale de leurs fonctions. Nous pensons alors qu'il serait important de déterminer si la dégradation de STAU2 en réponse à l'inhibition de la kinase CHK1 est précédée d'une relocalisation cellulaire. Pour cela, nous observerons la localisation de STAU2 en immunofluorescence.

## **STAU2 est-t-elle un substrat permanent des caspases?**

Les caspases sont des protéases à cystéine impliquées dans plusieurs voies cellulaires. Lorsqu'elles sont activées par les caspases régulatrices, les caspases exécutrices clivent leurs substrats à des sites spécifiques. Les caspases sont principalement actives dans un contexte d'apoptose et d'inflammation; elles ont été extensivement caractérisées dans ces deux processus cellulaires au cours du temps (265). Plus récemment, plusieurs études ont mis au jour leur implication dans des voies non reliées à l'apoptose (288). Il a notamment été rapporté que les caspases pouvaient être impliquées dans la prolifération cellulaire (454). De façon intrigante, nos résultats montrent qu'en plus d'être dégradée par les caspases lors de l'inhibition de la voie CHK1, STAU2 semble être un de leur substrat en l'absence de dommage à l'ADN. Cette observation est totalement inédite. En effet, nous avons montré avec deux inhibiteurs différents que l'inhibition des pan-caspases menait à une stabilisation significative de STAU2. De façon parallèle, nous avons montré que ces inhibitions faisaient disparaître deux bandes de clivage observées avec un anticorps spécifique anti-STAU2. Des bandes similaires ont également été observées lorsque nous avons surexprimé une construction STAU2-3-FLAG. En revanche, ces bandes sont totalement absentes lorsque nous observons des cellules où STAU2 est déplétée. Ces deux observations démontrent que ces fragments appartiennent bien à STAU2. Grâce à l'analyse du patron de clivage observé, nous avons été en mesure de déterminer que le site de clivage se trouvait dans la partie C-terminale de STAU2. Cette observation est rassurante puisqu'une analyse bio-informatique supposait la présence de 3 sites potentiels de clivage par les caspases dans cette zone.

De façon surprenante, nous n'avons pas identifié de caspase dans notre analyse des partenaires de proximité de STAU2. Les interactions entre les caspases et leurs substrats sont très rapides, ce qui pourrait expliquer qu'une interaction soit difficile à observer (455). En revanche, nous avons été surpris de retrouver une forte association entre STAU2 et les calpaïnes 1 et 2. Cette interaction est d'autant plus probable que, lorsque nous comparons nos résultats avec ceux de la base de données CRAPome, les calpaïnes n'ont jamais été retrouvées associées à la biotinylyase seule ce qui réduit la probabilité

d'une interaction non spécifique. Les calpaïnes sont des protéases calcium dépendantes impliquées dans la régulation de plusieurs voies cellulaires majeures (456). Elles participent entre autres à la motilité cellulaire, au contrôle du cycle cellulaire ou encore à l'apoptose (457-459). Les calpaïnes sont particulièrement importantes dans les neurones où elles participent à la plasticité synaptique et plus particulièrement à la potentiation et à la dépression synaptique à long terme (460, 461). Cela est particulièrement intéressant puisque STAU2 est impliquée dans des processus similaires dans les neurones (383). Les inhibiteurs dirigés contre les caspases que nous avons utilisés lors de nos expériences (ZVAD-FMK et Emricasan) sont en mesure d'inhiber également les calpaïnes aux concentrations utilisées. Cela laisse entrevoir la possibilité que l'effet que nous avons observé puisse dépendre des calpaïnes plutôt que caspases. Tester la possible implication des calpaïnes dans la dégradation de STAU2 sera donc notre prochaine priorité. Pour cela, nous proposons d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des calpaïnes. Lors de nos travaux, nous n'avons déterminé le site de clivage de STAU2 par les caspases que de façon approximative. Nous proposons donc de le caractériser plus précisément. Pour cela, nous envisageons de muter les trois sites potentiels de clivage qui se trouvent dans la zone identifiée précédemment et d'observer si ces mutants sont toujours dégradés en présence ou non d'inhibition de CHK1. À plus long terme, comme toujours pour les RBP, il sera important de déterminer si la dégradation de STAU2 par les caspases est dépendante ou non de la liaison aux ARN. Ce point pourrait paraître trivial mais il est bien connu que plusieurs aspects de la régulation des RBP tels que leur localisation varient en fonction de la liaison ou non aux ARN (462). C'est, par exemple, le cas de STAU2 dont certaines isoformes se relocalisent au noyau lorsqu'elles ne lient pas d'ARN (396). Ainsi hypothétiquement, la dégradation de STAU2 pourrait dépendre de sa localisation.

### **STAU2 joue un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire**

Jusqu'à présent, très peu de choses étaient connues sur l'impact de la diminution de STAU2 dans les cellules. Nous savons depuis déjà un certain temps que plusieurs

conditions mènent à la diminution de STAU2. En effet, notre laboratoire a précédemment rapporté que l'induction de bris simple brin à l'ADN induisait une diminution transcriptionnelle de STAU2 (392). À cette observation s'ajoute la découverte que nous venons de faire concernant la diminution de STAU2 en réponse à l'inhibition de la kinase CHK1. Nous avons donc décidé de créer une lignée cellulaire KO-STAU2 afin de mieux évaluer l'impact de sa disparition dans plusieurs processus cellulaires.

La prolifération cellulaire est un processus hautement régulé impliquant de nombreuses protéines de contrôle. La régulation de ces différents effecteurs a lieu tout autant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. Leur dérégulation peut perturber la progression du cycle cellulaire. C'est par exemple le cas de plusieurs oncogènes tels que MYC, BCL2, RAS, ou encore la cycline E pour n'en citer que quelques-uns. Ces protéines favorisent la progression non contrôlée du cycle cellulaire et la transformation tumorale (463). D'autre part, il arrive à l'inverse que sous certaines conditions les cellules déclenchent un processus d'arrêt définitif de prolifération cellulaire appelée sénescence. Les résultats que nous rapportons ici montrent clairement une implication de STAU2 dans le contrôle du cycle cellulaire d'une façon dépendante du type cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la déplétion de STAU2 dans la lignée cellulaire non transformée hTert-RPE1. Nous avons rapporté que la déplétion totale de STAU2 par la technique de CRISPR/Cas9 induisait une augmentation significative de la prolifération cellulaire. Afin de découvrir l'origine de cette prolifération accrue, nous avons analysé la progression du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Ainsi, nous avons pu montrer que les cellules KO-STAU2 rejoignent plus rapidement la phase  $G_2$  lorsqu'elles sont relâchées du point de contrôle  $G_1/S$ . Cette observation démontre que les cellules hTert-RPE1 KO-STAU2 progressent plus rapidement au travers des phases  $G_1$  et/ou S. Cette augmentation de prolifération associée avec une possible altération des points de contrôle du cycle cellulaire pourrait être compatible avec l'apparition d'une transformation oncogénique. En effet, l'expression d'oncogène induit en général une accélération de progression de la phase  $G_1$  accompagnée d'un



taux de prolifération accru (463). Ce point devra être confirmé, notamment par la réalisation de tests de formation de colonies en agar mou, l'identification de biomarqueurs tumoraux ou encore le séquençage du génome de ces cellules à la recherche de mutations. Le fait que ce phénomène puisse être supprimé par la surexpression de STAU2, nous indique que c'est bien la dérégulation de STAU2 qui en était la cause. De plus, nous avons rapporté une augmentation similaire de la prolifération dans des cellules hTert-RPE1 infectées avec des shRNA dirigés contre STAU2. Cela confirme que c'est bien la diminution de STAU2 qui est à l'origine de l'hyper-prolifération observée dans ces cellules. La confirmation du phénotype observé dans les hTert-RPE1 KO-STAU2 à l'aide de shRNA contre STAU2 a été une étape primordiale considérant le risque posé par l'étude de clones issus d'une cellule unique. En effet, chaque clone hTert-RPE1 KO-STAU2 présenté ici est amplifié à partir d'une cellule unique. Bien que l'étude de plusieurs clones ayant un phénotype similaire soutienne fortement nos observations, l'obtention de ces clones à partir d'un seul et unique RNA guide ne permet pas d'éliminer hors de tout doute la possible implication d'une cible secondaire dans le phénotype observé. Bien que les résultats obtenus avec les shRNA contre STAU2 dans le hTERT-RPE soient tout à fait valides et cohérents avec ceux obtenus pour les clones hTert-RPE1 KO-STAU2, ils auraient pu être bonifiés par la réalisation d'une vraie courbe de croissance à la place d'un simple essai de rétention au cristal violet.

Dans un second temps, nous avons étudié les conséquences de la diminution de STAU2 dans les fibroblastes pulmonaires non transformés IMR90. Nous avons montré que la diminution de STAU2 induisait dans ces cellules une forte diminution de prolifération compatible avec une entrée des cellules en sénescence. Ce phénotype a été partiellement confirmé avec l'utilisation d'un second shRNA dirigé contre STAU2. Plusieurs paramètres ont été étudiés dans ces cellules afin de nous assurer que leur arrêt de prolifération était bien dû à leur entrée en sénescence. Les cellules infectées avec le shRNA dirigé contre STAU2 montraient une augmentation de  $\beta$ -galactosidase, ce qui est caractéristique de l'installation de la sénescence. De plus, ces cellules présentaient une diminution typique de plusieurs gènes du cycle cellulaire et une stabilisation de

l'inhibiteur des CDK, p21. Ces différents éléments nous suggèrent fortement l'entrée des cellules IMR90 en sénescence en réponse à la diminution de STAU2. Nous pouvons toutefois noter qu'au septième jour post-infection une légère prolifération résiduelle des IMR90 est observable. Cette prolifération est probablement due à la méthode de mesure de la croissance cellulaire. En effet, en entrant en sénescence les cellules IMR90 grossissent et retiennent donc davantage le cristal violet, cela peut conduire à une surestimation de la prolifération. La période d'observation de la prolifération devrait être étendue à une plus longue période et un plus grand nombre de marqueurs de sénescence devrait être observé, tels que l'activation de p53, l'hypo-phosphorylation de RB, la diminution de gènes de la famille E2F, l'augmentation de SASP ou encore l'accumulation de dommages à l'ADN.

À première vue, les résultats que nous venons de rapporter pourraient sembler totalement contradictoires. En effet, dans les cellules hTERT-RPE1 la déplétion de STAU2 induit une hyper-prolifération notable alors qu'à l'opposé, dans les cellules IMR90, la diminution de STAU2 induit un arrêt de prolifération. Il est aujourd'hui bien connu que les RBP contrôlent de très nombreux processus cellulaires via la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Les RBP sont elles-mêmes hautement régulées et agissent de façon concertée; leur dérégulation est à l'origine de nombreux dysfonctionnements cellulaires (377, 464-468). En effet lorsque les RBP sont dérégulées les gènes qu'elles régulent normalement sont perturbés. Cela peut survenir de différentes façons. Parfois, les ARNm qui ne sont plus protégés seront dégradés sans même être traduits. Dans d'autres cas, des ARNm ne seront plus réprimés et s'exprimeront de façon non contrôlée. À cela s'ajoute le fait que les RBP contrôlent plusieurs ARN non codants qui eux aussi peuvent par cascade perturber l'expression de certains gènes. Il n'est donc pas du tout surprenant qu'il ait été rapporté à plusieurs reprises que la dérégulation des RBP avait un impact sur le contrôle du cycle cellulaire. Leur dérégulation est d'ailleurs très fréquemment associée au cancer. Dans ce contexte, la perturbation des RBP favorise généralement l'expression de proto-oncogènes qu'elles régulent négativement dans un contexte normal, favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire (378, 469-471). Nous pouvons donc penser que l'augmentation de prolifération observée dans les

cellules hTert-RPE1 est due à l'expression de proto-oncogènes normalement négativement régulés par STAU2. Une étude antérieure a d'ailleurs montré que STAU2 liait plusieurs ARNm codant pour des régulateurs du cycle cellulaire incluant de potentiels oncogènes (400). La possibilité que STAU2 puisse réguler des cibles du cycle cellulaire est renforcée par nos récentes observations qui soutiennent que STAU2 est elle-même régulée par la voie CHK1. Rappelons que CHK1 et ses effecteurs sont tout aussi importants pour la réponse aux dommages à l'ADN que pour le contrôle du cycle cellulaire.

La sénescence cellulaire se caractérise par un arrêt définitif de prolifération cellulaire accompagné de plusieurs modifications notamment morphologiques, métaboliques et moléculaires (306). Différents facteurs peuvent induire l'entrée des cellules en sénescence incluant l'expression d'oncogènes (472). En effet, en induisant une augmentation de prolifération cellulaire, les oncogènes conduisent à l'apparition de stress réplicatif et de dommages à l'ADN (298). Les cellules répondent dans certains cas à ce stress en déclenchant la sénescence cellulaire. Ces constatations nous fournissent alors un lien évident entre nos observations à priori divergentes dans les cellules hTert-RPE1 et dans les cellules IMR90. Il est plus qu'envisageable que l'effet à priori contradictoire observé dans ces deux lignées repose sur l'induction d'oncogènes en réponse à la diminution de l'expression de STAU2. Cela expliquerait à la fois l'hyperprolifération observée dans les cellules hTert-RPE1 et l'entrée en sénescence des cellules IMR90. Cette hypothèse est fortement soutenue par le fait que nous avons montré que la déplétion de STAU2 dans les cellules cancéreuses HeLa n'a pas d'impact sur la prolifération cellulaire. En effet, les cellules HeLa sont déjà hautement dérégulées. Elles possèdent un nombre aberrant de chromosomes et plusieurs oncogènes sont déjà surexprimés (473, 474). Il n'est donc pas surprenant qu'une modification supplémentaire d'un ou plusieurs régulateurs du cycle cellulaire n'engendre pas de nouvelle perturbation de leur prolifération. L'idée que la déplétion de STAU2 n'ait pas d'effet dans les cellules transformées est renforcée par le fait que des cellules cancéreuses HCT116 KO-STAU2 prolifèrent normalement (résultat non montré). Ce n'est pas la première fois que les protéines de liaison à l'ARN sont soupçonnées d'être impliquées dans la sénescence

cellulaire. En effet, plusieurs exemples sont rapportés dans la littérature. Dans la majorité des cas, la sénescence dépendante des RBP survient à cause d'une dérégulation du cycle cellulaire ou des voies de réponse aux dommages à l'ADN (475).

Un point nécessite d'attirer notre attention. Nous avons montré à la fois dans les cellules hTert-RPE1 et dans les cellules IMR90 que la diminution de STAU2 induisait la baisse de l'expression de plusieurs protéines des voies de réparation des dommages à l'ADN. Dans le cas des cellules IMR90, nous avons attribué cette baisse à l'entrée des cellules en sénescence. En effet, il est rapporté dans la littérature que plusieurs gènes du DDR incluant ceux dont il est question ici, sont diminués en réponse à l'installation de la sénescence (476). Cependant, il est également possible que la diminution d'une ou plusieurs protéines des voies de réparation des dommages à l'ADN induise l'accumulation de dommages suivie d'une entrée des cellules en sénescence, ça serait par exemple le cas dans un contexte d'inactivation de p53 (477). Ainsi, nous ne pouvons pas négliger l'hypothèse selon laquelle la diminution de STAU2 induirait une altération des capacités de réponse aux dommages. Celle-ci pourrait être suivie d'une accumulation de dommages à l'ADN qui favoriserait l'entrée des cellules en sénescence. Cette hypothèse est d'autant plus probable que nous avons montré que dans les cellules hTert-RPE1 la diminution de STAU2 induit une accumulation de dommages à l'ADN.

Enfin de façon surprenante lors de notre analyse des partenaires de proximité de STAU2 par BioID, nous avons identifié plusieurs protéines nucléolaires impliquées dans la ribogenèse telles que NOP56, NOP58 ou encore FBL (478). Des résultats antérieurs de notre laboratoire ont également montré que sous certaines conditions, STAU2 adopte une localisation nucléolaire (396). Ensemble, ces observations nous laissent supposer que STAU2 pourrait jouer un rôle dans la ribogenèse. La ribogenèse est un processus central des cellules et sa dérégulation peut conduire à la sénescence cellulaire (479). Nous pouvons imaginer qu'en l'absence de STAU2 la ribogenèse puisse être perturbée, conduisant au déclenchement de la sénescence. Nous avons également remarqué une forte interaction de proximité entre STAU2 et la protéine nucléolaire RSL1D1. RSL1D1 est une protéine encore peu caractérisée qui est impliquée dans plusieurs processus

cellulaires incluant la réponse au stress et la sénescence (479-481). Bien que l'interaction entre ces deux protéines reste entièrement à caractériser, elle renforce l'idée d'une localisation nucléolaire de STAU2.

À la lumière de tous ces résultats, nous planifions de réaliser plusieurs expériences complémentaires afin de mieux comprendre l'implication de STAU2 dans le contrôle de la prolifération cellulaire. STAU2, comme la plupart des RBP, a à la fois des fonctions dépendantes et non dépendantes des ARN qu'elle lie. Nous proposons donc, dans un premier temps, de déterminer si la liaison des ARN est essentielle pour la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, nous réaliserons des essais de complémentation dans les hTert-RPE1 KO-STAU2 ou dans les IMR90 shSTAU2 avec des mutants incapables de lier les ARNm. Ensuite, nous planifions de définir le transcriptome par RNA-Séq des clones hTert-RPE1 STAU2-KO. Cela nous permettra de comprendre plus en détail quels ARN sont affectés en l'absence de STAU2 et comment cela pourrait affecter la progression du cycle cellulaire. Parallèlement nous souhaitons continuer à caractériser la sénescence induite par la diminution de STAU2. Comme nous l'avons expliqué plus tôt, la sénescence cellulaire est majoritairement régulée par les voies p53 et p16. Nous proposons donc d'identifier laquelle de ces deux voies médie l'entrée des cellules en sénescence en réponse à la diminution du niveau d'expression de STAU2. Pour cela nous inhiberons simultanément STAU2 et l'une de ces deux voies par shRNA. Encore une fois, il sera important dans un second temps de déterminer si les effets observés sont dépendants ou non de la liaison à l'ARN.

### **Implication de STAU2 dans les voies du DDR**

Le DDR est un ensemble de voies complexes qui permet de répondre à l'apparition de dommages à l'ADN de façon coordonnée. Ce réseau inclut majoritairement des protéines de signalisation et des protéines régulatrices (50). Les RBP sont également impliquées à différents niveaux des voies de réponse aux dommages à l'ADN. Premièrement, les RBP, en accord avec leur fonction bien connue de régulateur de l'expression des gènes, contrôlent le devenir de plusieurs ARNm codant directement pour des protéines du DDR

(482, 483). Par ce biais, les RBP contribuent à la modulation de la réponse aux dommages à l'ADN. Dans d'autres cas, les RBP sont elles-mêmes la cible des protéines apicales du DDR afin de réguler le devenir d'ARN messagers qui permettent de renforcer les actions cellulaires initiées par le DDR (357). Plus récemment, plusieurs études, ont rapporté que les RBP participaient aux voies de réponse aux dommages à l'ADN via la régulation de longs ARN non codants (lncRNA) (229, 357). Plusieurs études démontrent l'implication des longs ARN non codants dans les voies du DDR (484, 485). Dans certains cas les lncRNA participent aux processus qui entourent la réponse aux dommages à l'ADN, tels que la modification de la chromatine (486) à proximité des sites de dommages. Dans d'autres cas, les lncRNA participent directement au recrutement des protéines du DDR au site de dommages à l'ADN (487). La localisation adéquate des longs ARN non codants est indispensable pour mener à bien leurs fonctions (488); ainsi les RBP au travers de leur localisation régulent indirectement ces fonctions.

Dans nos travaux, nous avons montré que la déplétion de STAU2 dans les cellules hTert-RPE1 induisait une stabilisation de  $\gamma$ H2AX. La phosphorylation des histones H2AX est une des premières étapes à survenir lors de l'apparition de bris à l'ADN (92). La quantité de  $\gamma$ H2AX est donc corrélée à la quantité de foci de dommages présents dans une cellule donnée. Ainsi le fait que les cellules hTert-RPE1 KO-STAU2 présentent une stabilisation de  $\gamma$ H2AX suggère que la diminution de STAU2 induit l'accumulation de dommages à l'ADN au cours du temps. Il est important de noter que l'observation seule de l'accumulation de  $\gamma$ H2AX par western-blot n'est pas suffisante. Afin de confirmer ce résultat il sera important dans le futur de mieux caractériser la présence de dommages à l'ADN. Cela pourra être fait en suivant la formation et l'évolution de foci de dommages à l'ADN par immunofluorescence. En complément, des tests tels que le *comet assay* pourront valider ces observations. Par ailleurs l'origine exacte de cette accumulation de dommages reste à clarifier. Deux hypothèses principales se sont dessinées au cours de nos recherches.

D'une part, il est envisageable que cette accumulation de dommages soit une conséquence collatérale de la dérégulation du cycle cellulaire induite par la déplétion de

STAU2. En effet nous avons montré que la déplétion de STAU2 induisait dans les cellules hTert-RPE1 une augmentation de la prolifération cellulaire et une dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Lorsque le cycle cellulaire est dérégulé et notamment lorsque la réplication et la mitose sont moins bien préparées, des dommages à l'ADN surviennent et une instabilité génomique peut s'installer (43).

D'autre part, il est envisageable que la déplétion de STAU2 soit directement impliquée dans l'apparition de dommages à l'ADN. En effet, nous avons montré que la déplétion de STAU2 induisait la diminution du niveau d'expression de certaines protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN. C'est par exemple le cas de certaines protéines de la famille Fanconi. Cette observation est d'autant plus intéressante que les ARNm de certains membres de cette famille tels que FANCONI D2 et FANCONI G sont liés par STAU2 (400). Ainsi, on peut aisément imaginer qu'en l'absence de STAU2 la diminution des différentes protéines de réparation altère les capacités des cellules à prendre en charge les dommages à l'ADN.

L'idée d'une implication directe de STAU2 dans les voies du DDR est également supportée par le fait que nous avons rapporté que STAU2 semble se trouver à proximité de plusieurs protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. La majorité de ces protéines sont des effecteurs apicaux des voies de réparation des dommages à l'ADN. De façon intéressante, en plus d'identifier des protéines isolées nous avons été capables de retrouver plusieurs complexes protéiques complets, ce qui renforce notre confiance dans ces résultats. Un exemple notable est le complexe KU70/KU80/DNA-PK. En présence de bris double brin à l'ADN, l'hétérodimère KU70/KU80 lie les extrémités libres de l'ADN. Cette liaison permet d'une part, de stabiliser les extrémités afin d'éviter des réactions non souhaitées, et d'autre part, de recruter la kinase majeure DNA-PK. Ensembles, les protéines de ce complexe favorisent la mise en place des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN et plus particulièrement le mécanisme NHEJ (117, 489). La présence de STAU2 proche de ces protéines suggère que STAU2 se trouve à proximité des foci de réparation des dommages à l'ADN.

Afin d'étudier davantage le rôle de STAU2 dans le DDR, nous proposons d'utiliser la nouvelle technique d'étude des interactions de proximité, TurboID. Cet outil permet de marquer les partenaires d'interaction d'une protéine cible dans un temps nettement plus court que la technique BioID (490). Nous profiterons de cette propriété pour étudier les partenaires de STAU2 tout en induisant différents types de dommages à l'ADN. Nous pourrons ainsi déterminer comment l'association de STAU2 avec les protéines du DDR varie en fonction de la présence ou non de ces différents dommages à l'ADN. En outre, nous planifions d'utiliser des techniques de microscopie à haute résolution afin d'étudier la localisation de STAU2 en présence de dommages à l'ADN. Nous voulons en particulier confirmer sa présence à proximité des foci de réparation et déterminer si sa localisation évolue dans le temps en fonction de la dynamique de ces foci.

### **STAU2, une protéine aux multiples fonctions cellulaires**

Lors de notre analyse des interactants de proximité de STAU2 par la technique BioID, nous avons identifié des protéines impliquées dans de nombreuses voies cellulaires. Cela était tout à fait cohérent avec le caractère multifonctionnel des RBP (341). De façon rassurante, nous avons été en mesure d'identifier la majorité des partenaires déjà connus de STAU2. En plus des protéines du DDR dont nous avons discuté plus haut, nous avons également retrouvé à proximité de STAU2, des protéines impliquées dans la plupart des étapes du métabolisme des ARN. Ainsi nous avons pu identifier plusieurs facteurs généraux de transcription, l'ARN polymérase II, le complexe de régulation CCR4-NOT, différents facteurs d'épissage et des régulateurs du catabolisme des ARN incluant UPF1, un partenaire bien connu de STAU2. Nous avons aussi retrouvé un nombre considérable de facteurs d'initiation de la traduction. Cela confirme le modèle couramment admis, selon lequel, STAU2, en tant que protéine de liaison à l'ARN, est associée à certains transcrits de leur transcription jusqu'à leur traduction.

De façon tout à fait intéressante, nous avons également identifié plusieurs protéines impliquées dans la réplication de l'ADN. Nous avons par exemple retrouvé presque tous les partenaires du complexe MCM. L'hélicase MCM précède la fourche de réplication



lors du processus de synthèse de l'ADN et aide à l'ouverture de l'hélice double brin (491). Jusqu'alors, aucune fonction de STAU2 dans la réplication ou à proximité des fourches de réplication n'a été rapportée. Cette observation devra être étudiée plus en détail dans le futur. Au vu de son aspect multifonctionnel, il n'est pas exclu que STAU2 participe directement aux processus de réplication de l'ADN. Il est également envisageable que STAU2 soit associée indirectement à ces processus. Il a été rapporté dans la littérature que plusieurs RBP sont associées aux hybrides ADN/ARN qui peuvent survenir lorsque les fourches de réplication entrent en collision avec la machinerie de transcription. Lors de telles collisions, plusieurs protéines du DDR sont recrutées localement (357, 492). Dans ce cas, des protéines impliquées respectivement dans la réplication, la transcription et le DDR se retrouvent à proximité, ce qui est cohérent avec nos observations.



## Conclusion

La recherche présentée dans ce mémoire de maîtrise contribue à approfondir nos connaissances sur les fonctions de la protéine de liaison à l'ARN STAU2 dans la physiologie cellulaire. Comme pour la majorité des RBP, le nombre de processus dans lesquels STAU2 est potentiellement impliquée n'est limité que par la diversité des ARNm qu'elle lie. Ce qui en fait donc un acteur majeur de la régulation cellulaire. Ici, nous avons rapporté un tout nouveau rôle de STAU2 dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité génomique. Ainsi, nous avons montré pour la première fois que la déplétion de STAU2 induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans les cellules hTert-RPE1. Cet effet est accompagné d'une stabilisation des histones H2AX phosphorylées laissant penser à une possible apparition d'instabilité génomique. Nous avons également mis de l'avant le fait que la déplétion de STAU2 induit à elle seule l'entrée des cellules IMR90 en sénescence. Par ailleurs, à l'aide d'une étude à large échelle des partenaires de proximité de STAU2, nous avons montré qu'elle était associée avec plusieurs protéines de la réponse proximale aux dommages à l'ADN incluant de façon notable, la kinase DNA-PK et ses deux partenaires KU70 et KU80. En outre, nous avons rapporté de nouvelles données sur la régulation de l'état basal de STAU2. Ainsi nous avons montré que la kinase CHK1 était nécessaire pour garantir la stabilité de STAU2 et la protéger d'une dégradation par les caspases. Ce phénomène est indépendant de la présence de dommages à l'ADN ou de l'induction de l'apoptose. En somme, nos résultats indiquent que STAU2 joue un rôle au croisement entre les voies de réponse aux dommages à l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire.

La meilleure compréhension des voies de réponse aux dommages à l'ADN est indispensable puisque le DDR est au carrefour des processus anti-tumoraux et de la carcinogénèse. La compréhension approfondie de ces voies permettra tantôt de prévenir l'apparition de mutations, en renforçant le DDR, tantôt d'inhiber sélectivement les voies de réparation, et ainsi faire tomber le dernier bouclier des cellules tumorales.



## Schéma récapitulatif

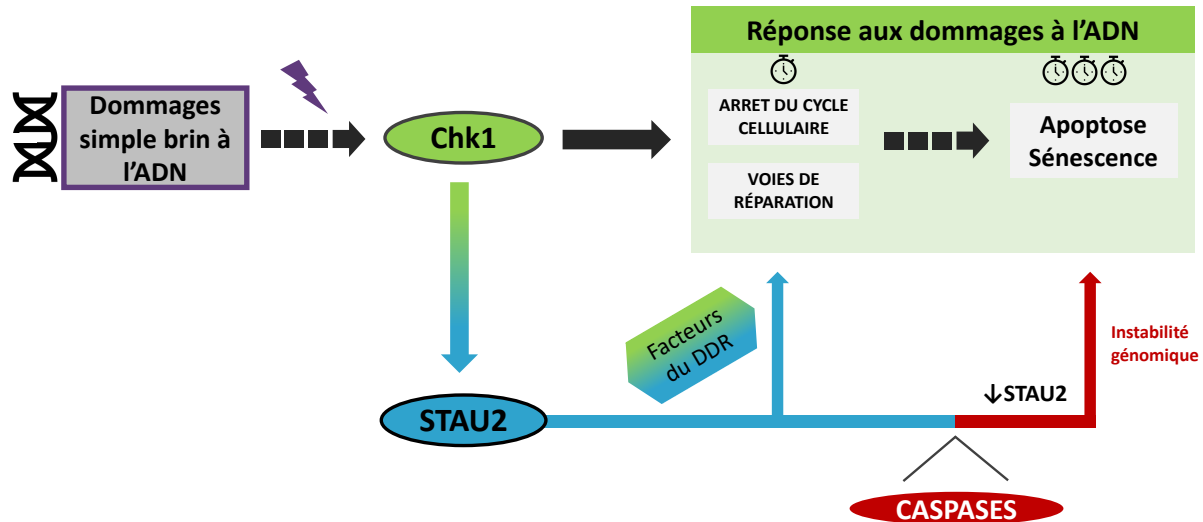


Figure 15.

### Figure 15: Implication de STAU2 dans le DDR et dans le contrôle du cycle cellulaire.

La présence de dommage simple brin à l'ADN ou de stress réplcatif induisent l'activation de la kinase centrale du DDR, CHK1. Une fois activée CHK1 induit un arrêt du cycle cellulaire et favorise la réparation des dommages à l'ADN. Le cas échéant, CHK1 médie dans un second temps, l'entrée des cellules en apoptose ou en sénescence cellulaire (vert). Dans notre recherche, nous avons montré que CHK1 était nécessaire pour maintenir le niveau basal de STAU2. En effet, la diminution de la kinase CHK1 induit une dégradation de STAU2 dépendante des caspases. Nous avons également rapporté que la diminution de STAU2 est à l'origine d'une perturbation du cycle cellulaire. En effet, nos données révèlent une augmentation de la prolifération cellulaire dans les cellules hTerT-RPE1 et une entrée des cellules en sénescence dans les cellules IMR90. De plus, la déplétion de STAU2 est à l'origine d'une accumulation de dommages à l'ADN. En outre, STAU2 interagit avec plusieurs protéines se retrouvant aux foci de réparation des dommages à l'ADN. Ces différentes observations suggèrent son implication dans les voies du DDR et dans le contrôle du cycle cellulaire.



## Références bibliographiques

1. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227(5258):561-3.
2. Aguilera A, García-Muse T. Causes of Genome Instability. *Annual Review of Genetics*. 2013;47(1):1-32.
3. Ciccica A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
4. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(3):220-8.
5. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
6. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
7. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004;19(3):169-85.
8. Aguilera A, Gómez-González B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(3):204-17.
9. Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, et al. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13300-5.
10. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem*. 1992;267(1):166-72.
11. Lawley PD, Brookes P. FURTHER STUDIES ON THE ALKYLATION OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR CONSTITUENT NUCLEOTIDES. *Biochem J*. 1963;89:127-38.
12. Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer research*. 2008;68(17):6863-72.
13. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993;362(6422):709-15.
14. Huang Y, Li L. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. *Transl Cancer Res*. 2013;2(3):144-54.
15. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*. 2008;9(8):619-31.
16. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(15):8241-6.
17. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*. 2016;26(1):52-64.
18. Cannan WJ, Pederson DS. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):3-14.
19. Roy S. Impact of UV Radiation on Genome Stability and Human Health. *Adv Exp Med Biol*. 2017;996:207-19.

20. Ravanat J-L, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001;63(1):88-102.
21. Cortat B, Garcia CCM, Quinet A, Schuch AP, de Lima-Bessa KM, Menck CFM. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2013;12(8):1483-95.
22. Karran P, Brem R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:178-85.
23. Sage E, Girard PM, Francesconi S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(1):74-80.
24. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2015;91(1):140-55.
25. Dahle J, Kvam E. Induction of Delayed Mutations and Chromosomal Instability in Fibroblasts after UVA-, UVB-, and X-Radiation. *Cancer Research*. 2003;63(7):1464-9.
26. Lane GR. X-ray fractionation and chromosome breakage. *Heredity (Edinb)*. 1951;5(1):1-35.
27. Corry PM, Cole A. Radiation-induced double-strand scission of the DNA of mammalian metaphase chromosomes. *Radiat Res*. 1968;36(3):528-43.
28. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*. 2012;46(4):382-419.
29. Nikjoo H, O'Neill P, Wilson WE, Goodhead DT. Computational Approach for Determining the Spectrum of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. *Radiation Research*. 2001;156(5):577-83.
30. Henner WD, Grunberg SM, Haseltine WA. Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(19):11750-4.
31. Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(1):103-8.
32. Asaithamby A, Chen DJ. Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutat Res*. 2011;711(1-2):87-99.
33. Baan R, Grosse Y, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part F: chemical agents and related occupations. *Lancet Oncol*. 2009;10(12):1143-4.
34. Poirier MC. Linking DNA adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2016;57(7):499-507.
35. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;206(1):73-93.
36. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1985;260(27):14873-8.
37. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2018:101084.
38. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*. 2017;168(4):644-56.



39. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(7):1126-67.
40. Schaarschmidt D, Ladenburger E-M, Keller C, Knippers R. Human Mcm proteins at a replication origin during the G1 to S phase transition. *Nucleic acids research*. 2002;30(19):4176-85.
41. Boos D, Frigola J, Diffley JF. Activation of the replicative DNA helicase: breaking up is hard to do. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(3):423-30.
42. Techer H, Koundrioukoff S, Nicolas A, Debatisse M. The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet*. 2017;18(9):535-50.
43. Hills SA, Diffley JF. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R435-44.
44. Ekholm-Reed S, Mendez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol*. 2004;165(6):789-800.
45. Helmrich A, Ballarino M, Tora L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol Cell*. 2011;44(6):966-77.
46. Gaillard H, Herrera-Moyano E, Aguilera A. Transcription-associated genome instability. *Chem Rev*. 2013;113(11):8638-61.
47. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):792-804.
48. Taylor MRG, Yeeles JTP. Dynamics of Replication Fork Progression Following Helicase-Polymerase Uncoupling in Eukaryotes. *J Mol Biol*. 2019;431(10):2040-9.
49. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 2003;300(5625):1542-8.
50. Sirbu BM, Cortez D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):a012724.
51. Lanz MC, Dibitetto D, Smolka MB. DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *Embo j*. 2019;38(18):e101801.
52. Volkert MR, Landini P. Transcriptional responses to DNA damage. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4(2):178-85.
53. Abraham RT. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):883-7.
54. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-17.
55. Raderschall E, Golub EI, Haaf T. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):1921-6.
56. Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 2001;294(5547):1713-6.
57. Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L. Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1009-14.
58. Zou L, Cortez D, Elledge SJ. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev*. 2002;16(2):198-208.

59. Rappas M, Oliver AW, Pearl LH. Structure and function of the Rad9-binding region of the DNA-damage checkpoint adaptor TopBP1. *Nucleic acids research*. 2011;39(1):313-24.
60. Mordes DA, Glick GG, Zhao R, Cortez D. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev*. 2008;22(11):1478-89.
61. Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*. 2006;124(5):943-55.
62. Haahr P, Hoffmann S, Tollenaere MA, Ho T, Toledo LI, Mann M, et al. Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nat Cell Biol*. 2016;18(11):1196-207.
63. Bao S, Lu T, Wang X, Zheng H, Wang L-E, Wei Q, et al. Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects. *Oncogene*. 2004;23(33):5586-93.
64. Jeon Y, Ko E, Lee KY, Ko MJ, Park SY, Kang J, et al. TopBP1 deficiency causes an early embryonic lethality and induces cellular senescence in primary cells. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5414-22.
65. Bass TE, Luzwick JW, Kavanaugh G, Carroll C, Dugrawala H, Glick GG, et al. ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat Cell Biol*. 2016;18(11):1185-95.
66. Liu S, Shiotani B, Lahiri M, Marechal A, Tse A, Leung CC, et al. ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. *Mol Cell*. 2011;43(2):192-202.
67. Nam EA, Zhao R, Glick GG, Bansbach CE, Friedman DB, Cortez D. Thr-1989 phosphorylation is a marker of active ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) kinase. *J Biol Chem*. 2011;286(33):28707-14.
68. Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lukas C, Bartek J, Lukas J. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(16):6056-64.
69. Chini CC, Chen J. Claspin, a regulator of Chk1 in DNA replication stress pathway. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1033-7.
70. Kumagai A, Dunphy WG. Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nat Cell Biol*. 2003;5(2):161-5.
71. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(13):4129-39.
72. Okita N, Minato S, Ohmi E, Tanuma S, Higami Y. DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Lett*. 2012;586(22):3974-9.
73. Blasius M, Forment JV, Thakkar N, Wagner SA, Choudhary C, Jackson SP. A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biology*. 2011;12(8):R78.
74. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70(21):4009-21.
75. Iyer DR, Rhind N. The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes (Basel)*. 2017;8(2):74.

76. Jin J, Shirogane T, Xu L, Nalepa G, Qin J, Elledge SJ, et al. SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes & development*. 2003;17(24):3062-74.
77. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, et al. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 1997;277(5331):1497-501.
78. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*. 2000;14(3):289-300.
79. Seiler JA, Conti C, Syed A, Aladjem MI, Pommier Y. The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol*. 2007;27(16):5806-18.
80. Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol*. 2005;25(9):3553-62.
81. Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, et al. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol*. 2004;6(9):884-91.
82. Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, et al. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell*. 2007;12(2):247-60.
83. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & development*. 2000;14(12):1448-59.
84. Dupre A, Boyer-Chatenet L, Gautier J. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(5):451-7.
85. Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH. Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet*. 2008;49(4):383-96.
86. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(13):5363-79.
87. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003;421(6922):499-506.
88. So S, Davis AJ, Chen DJ. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J Cell Biol*. 2009;187(7):977-90.
89. Daniel JA, Pellegrini M, Lee J-H, Paull TT, Feigenbaum L, Nussenzweig A. Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo. *The Journal of cell biology*. 2008;183(5):777-83.
90. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(37):13182-7.
91. Paull TT. Mechanisms of ATM Activation. *Annual Review of Biochemistry*. 2015;84(1):711-38.
92. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68.

93. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42462-7.
94. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007;316(5828):1160-6.
95. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*. 2008;36(17):5678-94.
96. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 2005;123(7):1213-26.
97. Jungmichel S, Clapperton JA, Lloyd J, Hari FJ, Spycher C, Pavic L, et al. The molecular basis of ATM-dependent dimerization of the Mdc1 DNA damage checkpoint mediator. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(9):3913-28.
98. Chapman JR, Jackson SP. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep*. 2008;9(8):795-801.
99. Spycher C, Miller ES, Townsend K, Pavic L, Morrice NA, Janscak P, et al. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol*. 2008;181(2):227-40.
100. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10389-94.
101. Ahn JY, Schwarz JK, Piwnicka-Worms H, Canman CE. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2000;60(21):5934-6.
102. Schwarz JK, Lovly CM, Piwnicka-Worms H. Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res*. 2003;1(8):598-609.
103. Kodama M, Otsubo C, Hirota T, Yokota J, Enari M, Taya Y. Requirement of ATM for rapid p53 phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln sequences. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(7):1620-33.
104. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*. 2014;6(6):442-57.
105. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*. 1999;286(5442):1162-6.
106. Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, et al. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 2007;131(5):901-14.
107. Thorslund T, Ripplinger A, Hoffmann S, Wild T, Uckelmann M, Villumsen B, et al. Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature*. 2015;527(7578):389-93.

108. Mattioli F, Vissers JH, van Dijk WJ, Ikpa P, Citterio E, Vermeulen W, et al. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell*. 2012;150(6):1182-95.
109. Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escribano-Diaz C, Orthwein A, Leung CC, Huang H, et al. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*. 2013;499(7456):50-4.
110. DiTullio Jr RA, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, et al. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature Cell Biology*. 2002;4:998.
111. Imray FP, Kidson C. Perturbations of cell-cycle progression in gamma-irradiated ataxia telangiectasia and Huntington's disease cells detected by DNA flow cytometric analysis. *Mutat Res*. 1983;112(6):369-82.
112. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 1992;71(4):587-97.
113. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 2001;412(6847):607-14.
114. Downs JA, Jackson SP. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):367-78.
115. Shao Z, Davis AJ, Fattah KR, So S, Sun J, Lee KJ, et al. Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. 2012;11(3):310-6.
116. Yoo S, Dynan WS. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(24):4679-86.
117. Davis AJ, Chen BPC, Chen DJ. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair (Amst)*. 2014;17:21-9.
118. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2004;64(7):2390-6.
119. Li J, Stern DF. Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2005;280(12):12041-50.
120. Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*. 1998;394(6694):700-4.
121. Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, et al. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *Embo j*. 2006;25(24):5775-82.
122. Zhou Y, Lee JH, Jiang W, Crowe JL, Zha S, Paull TT. Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM. *Mol Cell*. 2017;65(1):91-104.
123. Gatei M, Sloper K, Sorensen C, Syljuasen R, Falck J, Hobson K, et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*. 2003;278(17):14806-11.

124. Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2008;283(10):6572-83.
125. Maréchal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9):a012716.
126. Conlon I, Raff M. Size control in animal development. *Cell.* 1999;96(2):235-44.
127. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2013;14(8):518-28.
128. Jorgensen P, Tyers M. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol.* 2004;14(23):R1014-27.
129. Taylor JH, Woods PS, Hughes WL. THE ORGANIZATION AND DUPLICATION OF CHROMOSOMES AS REVEALED BY AUTORADIOGRAPHIC STUDIES USING TRITIUM-LABELED THYMIDINE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1957;43(1):122-8.
130. Takeda DY, Dutta A. DNA replication and progression through S phase. *Oncogene.* 2005;24(17):2827-43.
131. Pederson T. Chromatin structure and the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1972;69(8):2224-8.
132. Ma Y, Kanakousaki K, Buttitta L. How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate. *Front Genet.* 2015;6:19-.
133. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2009;10:192.
134. Hirano T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):311-22.
135. Wieser S, Pines J. The biochemistry of mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(3):a015776-a.
136. Hagstrom KA, Meyer BJ. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat Rev Genet.* 2003;4(7):520-34.
137. Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):33-46.
138. Goshima G, Vale RD. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *The Journal of cell biology.* 2003;162(6):1003-16.
139. Hyams JS. Cytokinesis: the great divide. *Trends Cell Biol.* 2005;15(1):1.
140. Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 2013;23(7):345-56.
141. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:261-91.
142. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature reviews Cancer.* 2017;17(2):93-115.
143. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013;140(15):3079-93.
144. John PC, Mews M, Moore R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma.* 2001;216(3-4):119-42.
145. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J.* 1995;308 ( Pt 3):697-711.

146. Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(4):559-73.
147. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research.* 2002;12(1):9-18.
148. Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade. *Kidney Int.* 1999;56(4):1258-61.
149. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 2006;25(38):5220-7.
150. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998;12(15):2245-62.
151. Blais A, Dynlacht BD. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(5):527-32.
152. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene.* 2005;24(17):2810-26.
153. Blais A, Dynlacht BD. E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Current opinion in cell biology.* 2007;19(6):658-62.
154. Iaquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(6):649-57.
155. Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(26):12146-50.
156. Koepp 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;294(5540):173-7.
157. Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, DeCarprio JA. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 1993;13(1):367-72.
158. Furuno N, den Elzen N, Pines J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol.* 1999;147(2):295-306.
159. 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;376(6538):313-20.
160. Enserink JM, Kolodner RD. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.* 2010;5:11-.
161. Harvey SL, Charlet A, Haas W, Gygi SP, Kellogg DR. Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell.* 2005;122(3):407-20.
162. Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, Kempf T, Hoffmann I. Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16978-90.
163. Hershko A. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354(1389):1571-6.
164. and DGJ, Walker CL. CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1999;39(1):295-312.

165. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(4):199-210.
166. Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports*. 2003;4(7):671-7.
167. Lobrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):861-9.
168. Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(3):551-63.
169. Reinhardt HC, Yaffe MB. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14:563.
170. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):316-23.
171. Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*. 1997;11(24):3471-81.
172. Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*. 2006;13(6):941-50.
173. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2016;42:63-71.
174. Kotula E, Faigle W, Berthault N, Dingli F, Loew D, Sun J-S, et al. DNA-PK target identification reveals novel links between DNA repair signaling and cytoskeletal regulation. *PloS one*. 2013;8(11):e80313-e.
175. Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenberger AL, Bernstein WZ, Hasty PE, Stambrook PJ. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*. 2008;27(28):3977-85.
176. Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, et al. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*. 2005;7(2):195-201.
177. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(5):10.1101/cshperspect.a026070 a.
178. Huen MS, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res*. 2008;18(1):8-16.
179. Yazinski SA, Comaills V, Buisson R, Genoie MM, Nguyen HD, Ho CK, et al. ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes Dev*. 2017;31(3):318-32.
180. Callen E, Jankovic M, Wong N, Zha S, Chen HT, Difilippantonio S, et al. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell*. 2009;34(3):285-97.
181. Kim D, Liu Y, Oberly S, Freire R, Smolka MB. ATR-mediated proteome remodeling is a major determinant of homologous recombination capacity in cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(16):8311-25.
182. Wang H, Wang H, Powell SN, Iliakis G, Wang Y. ATR affecting cell radiosensitivity is dependent on homologous recombination repair but independent of nonhomologous end joining. *Cancer Res*. 2004;64(19):7139-43.



183. Shiotani B, Zou L. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell*. 2009;33(5):547-58.
184. Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, et al. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res*. 2012;72(5):1149-56.
185. Zhou Y, Paull TT. DNA-dependent protein kinase regulates DNA end resection in concert with Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) and ataxia telangiectasia-mutated (ATM). *J Biol Chem*. 2013;288(52):37112-25.
186. Gapud EJ, Sleckman BP. Unique and redundant functions of ATM and DNA-PKcs during V(D)J recombination. *Cell Cycle*. 2011;10(12):1928-35.
187. Stadler J, Richly H. Regulation of DNA Repair Mechanisms: How the Chromatin Environment Regulates the DNA Damage Response. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1715.
188. Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Muller WG, McNally JG, et al. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2006;172(6):823-34.
189. Burgers PMJ, Kunkel TA. Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry*. 2017;86(1):417-38.
190. Pasero P, Vindigni A. Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annu Rev Genet*. 2017;51:477-99.
191. Patel DR, Weiss RS. A tough row to hoe: when replication forks encounter DNA damage. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(6):1643-51.
192. El-Shemerly M, Hess D, Pyakurel AK, Moselhy S, Ferrari S. ATR-dependent pathways control hEXO1 stability in response to stalled forks. *Nucleic acids research*. 2008;36(2):511-9.
193. Engels K, Giannattasio M, Muzi-Falconi M, Lopes M, Ferrari S. 14-3-3 Proteins regulate exonuclease 1-dependent processing of stalled replication forks. *PLoS Genet*. 2011;7(4):e1001367.
194. Ammazalorso F, Pirzio LM, Bignami M, Franchitto A, Pichiari P. ATR and ATM differently regulate WRN to prevent DSBs at stalled replication forks and promote replication fork recovery. *The EMBO journal*. 2010;29(18):3156-69.
195. Davies SL, North PS, Dart A, Lakin ND, Hickson ID. Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):1279-91.
196. Kaur S, Modi P, Srivastava V, Mudgal R, Tikoo S, Arora P, et al. Chk1-dependent constitutive phosphorylation of BLM helicase at serine 646 decreases after DNA damage. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8(9):1234-47.
197. Couch FB, Bansbach CE, Driscoll R, Luzwick JW, Glick GG, Betous R, et al. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev*. 2013;27(14):1610-23.
198. Yekezare M, Gomez-Gonzalez B, Diffley JF. Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 6):1297-306.

199. McIntosh D, Blow JJ. Dormant origins, the licensing checkpoint, and the response to replicative stresses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10):10.1101/cshperspect.a012955 a.
200. Guo C, Kumagai A, Schlacher K, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG. Interaction of Chk1 with Treslin negatively regulates the initiation of chromosomal DNA replication. *Mol Cell.* 2015;57(3):492-505.
201. Mueller AC, Keaton MA, Dutta A. DNA replication: mammalian Treslin-TopBP1 interaction mirrors yeast Sld3-Dpb11. *Current biology : CB.* 2011;21(16):R638-R40.
202. Sørensen CS, Syljuåsen RG. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic acids research.* 2012;40(2):477-86.
203. Tanaka S, Tak Y-S, Araki H. The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. *Cell Div.* 2007;2:16-.
204. Cortez D. Replication-Coupled DNA Repair. *Mol Cell.* 2019;74(5):866-76.
205. Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research.* 2008;18(1):99-113.
206. Goodman MF, Woodgate R. Translesion DNA polymerases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a010363-a.
207. Pai C-C, Kearsley SE. A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes (Basel).* 2017;8(2):57.
208. Mathews CK. Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2015;15:528.
209. Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, et al. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* 2010;24(4):333-8.
210. Günesdogan U, Jäckle H, Herzig A. Histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression. *Elife.* 2014;3:e02443-e.
211. Groth A, Ray-Gallet D, Quivy JP, Lukas J, Bartek J, Almouzni G. Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Mol Cell.* 2005;17(2):301-11.
212. Kaygun H, Marzluff WF. Translation termination is involved in histone mRNA degradation when DNA replication is inhibited. *Molecular and cellular biology.* 2005;25(16):6879-88.
213. Choe J, Kim KM, Park S, Lee YK, Song OK, Kim MK, et al. Rapid degradation of replication-dependent histone mRNAs largely occurs on mRNAs bound by nuclear cap-binding proteins 80 and 20. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(2):1307-18.
214. Müller B, Blackburn J, Feijoo C, Zhao X, Smythe C. DNA-activated protein kinase functions in a newly observed S phase checkpoint that links histone mRNA abundance with DNA replication. *The Journal of cell biology.* 2007;179(7):1385-98.
215. Quivy JP, Almouzni G. Rad53: a controller ensuring the fine-tuning of histone levels. *Cell.* 2003;115(5):508-10.
216. Zou Y, Liu Y, Wu X, Shell SM. Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol.* 2006;208(2):267-73.

217. Toledo L, Neelsen KJ, Lukas J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol Cell*. 2017;66(6):735-49.
218. Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, et al. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*. 2013;155(5):1088-103.
219. Pankotai T, Bonhomme C, Chen D, Soutoglou E. DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(3):276-82.
220. Heine GF, Horwitz AA, Parvin JD. Multiple mechanisms contribute to inhibit transcription in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2008;283(15):9555-61.
221. Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell*. 2010;141(6):970-81.
222. Porter JR, Fisher BE, Baranello L, Liu JC, Kambach DM, Nie Z, et al. Global Inhibition with Specific Activation: How p53 and MYC Redistribute the Transcriptome in the DNA Double-Strand Break Response. *Mol Cell*. 2017;67(6):1013-25.e9.
223. Venkata Narayanan I, Paulsen MT, Bedi K, Berg N, Ljungman EA, Francia S, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53. *Sci Rep*. 2017;7:43598.
224. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2003;5(5):401-9.
225. Ljungman M, Lane DP. Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):727-37.
226. Sharma V, Misteli T. Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS Lett*. 2013;587(13):1832-9.
227. Wei W, Ba Z, Gao M, Wu Y, Ma Y, Amiard S, et al. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*. 2012;149(1):101-12.
228. Gao M, Wei W, Li MM, Wu YS, Ba Z, Jin KX, et al. Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Cell Res*. 2014;24(5):532-41.
229. Michelini F, Pitchiaya S, Vitelli V, Sharma S, Gioia U, Pessina F, et al. Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nature Cell Biology*. 2017;19:1400.
230. Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, Rodier F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet*. 2015;6:94.
231. Sokolov MV, Dickey JS, Bonner WM, Martin OA.  $\gamma$ H2AX in Bystander Cells: Not Just a Radiation-Triggered Event, a Cellular Response to Stress Mediated by Intercellular Communication. *Cell Cycle*. 2007;6(18):2210-2.
232. Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003;22(45):7058-69.
233. Dutta S, Warshall C, Bandyopadhyay C, Dutta D, Chandran B. Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(5):e97580.

234. Wherley J, Kamimae-Lanning AN, Goloviznina NA, Huan J, Kurre P. Induction of DNA Damage Response and Repair Pathways in HSPCs Following Exposure to AML Exosomes. *Blood*. 2014;124(21):4324-.
235. Mo LJ, Song M, Huang QH, Guan H, Liu XD, Xie DF, et al. Exosome-packaged miR-1246 contributes to bystander DNA damage by targeting LIG4. *Br J Cancer*. 2018;119(4):492-502.
236. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
237. Faget DV, Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2019;19(8):439-53.
238. Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO journal*. 2008;27(4):589-605.
239. Yi C, He C. DNA repair by reversal of DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a012575-a.
240. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(5):335-46.
241. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):297-308.
242. Beard WA, Horton JK, Prasad R, Wilson SH. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*. 2019;88(1):137-62.
243. Marteiijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(7):465-81.
244. Rodgers K, McVey M. Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):15-24.
245. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(8):495-506.
246. Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(1):11-6.
247. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(7):467-80.
248. Carlessi L, Buscemi G, Fontanella E, Delia D. A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(10):1213-23.
249. Wlodarchak N, Xing Y. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;51(3):162-84.
250. Moon S-H, Nguyen T-A, Darlington Y, Lu X, Donehower LA. Dephosphorylation of  $\gamma$ -H2AX by WIP1: an important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(11):2092-6.
251. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*. 2005;20(5):801-9.

252. Cha H, Lowe JM, Li H, Lee J-S, Belova GI, Bulavin DV, et al. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer research*. 2010;70(10):4112-22.
253. Batchelor E, Loewer A, Lahav G. The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(5):371-7.
254. Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, et al. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6048-53.
255. Margolis SS, Perry JA, Forester CM, Nutt LK, Guo Y, Jardim MJ, et al. Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell*. 2006;127(4):759-73.
256. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):440-50.
257. Zhivotovsky B, Kroemer G. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(9):752-62.
258. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*. 2018;36(1):489-517.
259. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2000;301(1):5-17.
260. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet*. 1993;341(8855):1251-4.
261. Zangemeister-Wittke U, Simon HU. Apoptosis - Regulation and clinical implications. *Cell Death & Differentiation*. 2001;8(5):537-44.
262. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(3):175-93.
263. Geske FJ, Lieberman R, Strange R, Gerschenson LE. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differ*. 2001;8(2):182-91.
264. Tang HL, Yuen KL, Tang HM, Fung MC. Reversibility of apoptosis in cancer cells. *Br J Cancer*. 2008;100:118.
265. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015;22(4):526-39.
266. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 2000;103(4):645-54.
267. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(4):279-96.
268. Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Science*. 2009;122(16):2801-8.
269. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11549-56.
270. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*. 2000;287(5459):1824-7.
271. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001;7(3):683-94.

272. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science*. 2003;116(20):4077-85.
273. Zhang Y, Xing D, Liu L. PUMA promotes Bax translocation by both directly interacting with Bax and by competitive binding to Bcl-X L during UV-induced apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(13):3077-87.
274. Urist M, Tanaka T, Poyurovsky MV, Prives C. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes & development*. 2004;18(24):3041-54.
275. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*. 2004;279(9):8076-83.
276. Flinterman M, Guelen L, Ezzati-Nik S, Killick R, Melino G, Tominaga K, et al. E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5945-59.
277. Rada M, Barlev N, Macip S. BTK modulates p73 activity to induce apoptosis independently of p53. *Cell Death Discovery*. 2018;4(1):95.
278. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88(3):355-65.
279. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6).
280. Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med*. 2000;192(8):F21-F5.
281. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1380-9.
282. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*. 2009;138(5):838-54.
283. Matsuura K, Wakasugi M, Yamashita K, Matsunaga T. Cleavage-mediated activation of Chk1 during apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283(37):25485-91.
284. Smith GC, d'Adda di Fagagna F, Lakin ND, Jackson SP. Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(9):6076-84.
285. Semple JI, Smits VA, Feraud JR, Mamely I, Freire R. Cleavage and degradation of Caspin during apoptosis by caspases and the proteasome. *Cell Death Differ*. 2007;14(8):1433-42.
286. Solier S, Pommier Y. MDC1 cleavage by caspase-3: a novel mechanism for inactivating the DNA damage response during apoptosis. *Cancer Res*. 2011;71(3):906-13.
287. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002;9(3):459-70.
288. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):475-93.
289. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
290. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
291. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*. 2019;20(5):299-309.

292. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19(18):2100-10.
293. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):703-9.
294. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* 2005;126(1):111-7.
295. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):729-40.
296. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & development.* 1998;12(19):2997-3007.
297. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 2005;436(7051):725-30.
298. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 2006;444(7119):638-42.
299. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997;88(5):593-602.
300. Mallette FA, Gaumont-Leclerc M-F, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes & development.* 2007;21(1):43-8.
301. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer.* 2015;15:397.
302. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 2006;5(2):187-95.
303. Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 1):68-81.
304. Zhang R, Chen W, Adams PD. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol.* 2007;27(6):2343-58.
305. Lecot P, Alimirah F, Desprez P-Y, Campisi J, Wiley C. Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer.* 2016;114(11):1180-4.
306. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology.* 2011;192(4):547-56.
307. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424-35.
308. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):859-67.
309. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(24):13742-7.

310. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32(33):3789-97.
311. Eliopoulos AG, Havaki S, Gorgoulis VG. DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. *Front Genet*. 2016;7:204-.
312. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, et al. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry*. 2016;85(1):685-713.
313. Liang N, He Q, Liu X, Sun H. Multifaceted roles of ATM in autophagy: From nonselective autophagy to selective autophagy. *Cell Biochem Funct*. 2019;37(3):177-84.
314. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(1):37-43.
315. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):937-48.
316. Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006;25(43):5912-9.
317. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006;25(43):5906-11.
318. Poplawski T, Pastwa E, Blasiak J. Non-homologous DNA end joining in normal and cancer cells and its dependence on break structures. *Genet Mol Biol*. 2010;33(2):368-73.
319. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death & Differentiation*. 2019;26(2):199-212.
320. Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, Chambwe N, Gao GF, Cherniack AD, et al. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep*. 2018;23(1):239-54.e6.
321. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005;434(7035):907-13.
322. McKinnon PJ. DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(2):100-12.
323. Subba Rao K. Mechanisms of Disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2007;3(3):162-72.
324. Yu H, Harrison FE, Xia F. Altered DNA repair; an early pathogenic pathway in Alzheimer's disease and obesity. *Scientific Reports*. 2018;8(1):5600.
325. Askeland G, Dosoudilova Z, Rodinova M, Klempir J, Liskova I, Kuśnierczyk A, et al. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Scientific Reports*. 2018;8(1):9817.
326. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*. 2007;145(4):1388-96.
327. Chabner BA, Roberts TG, Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):65-72.
328. Oka K, Tanaka T, Enoki T, Yoshimura K, Ohshima M, Kubo M, et al. DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(3):246-52.



329. Halazonetis TD. Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of p53 mutations in human cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1057-62.
330. Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(2):81-104.
331. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):193-204.
332. Struhl K. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell*. 1999;98(1):1-4.
333. Matia-Gonzalez AM, Laing EE, Gerber AP. Conserved mRNA-binding proteomes in eukaryotic organisms. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(12):1027-33.
334. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*. 2014;15(12):829-45.
335. Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):479-90.
336. St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(22):10979-83.
337. Maris C, Dominguez C, Allain FH. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs j*. 2005;272(9):2118-31.
338. Font J, Mackay JP. Beyond DNA: zinc finger domains as RNA-binding modules. *Methods Mol Biol*. 2010;649:479-91.
339. Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains. *Febs j*. 2008;275(11):2712-26.
340. Huang R, Han M, Meng L, Chen X. Transcriptome-wide discovery of coding and noncoding RNA-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(17):E3879-E87.
341. Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19:327.
342. Dominguez D, Freese P, Alexis MS, Su A, Hochman M, Palden T, et al. Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Mol Cell*. 2018;70(5):854-67.e9.
343. St Johnston D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):363-75.
344. Baumann S, Pohlmann T, Jungbluth M, Brachmann A, Feldbrugge M. Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 11):2740-52.
345. Holt CE, Martin KC, Schuman EM. Local translation in neurons: visualization and function. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2019;26(7):557-66.
346. Berleth T, Burri M, Thoma G, Bopp D, Richstein S, Frigerio G, et al. The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *The EMBO journal*. 1988;7(6):1749-56.

347. Zanzoni A, Spinelli L, Ribeiro DM, Tartaglia GG, Brun C. Post-transcriptional regulatory patterns revealed by protein-RNA interactions. *Scientific Reports*. 2019;9(1):4302.
348. Wang C, Dickinson LK, Lehmann R. Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev Dyn*. 1994;199(2):103-15.
349. Fu XD, Ares M, Jr. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*. 2014;15(10):689-701.
350. Elkon R, Ugalde AP, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet*. 2013;14(7):496-506.
351. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):113-26.
352. Hasan A, Cotobal C, Duncan CDS, Mata J. Systematic analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability. *PLoS genetics*. 2014;10(11):e1004684-e.
353. Zhang X, Wan G, Berger FG, He X, Lu X. The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response. *Mol Cell*. 2011;41(4):371-83.
354. Lasko P. mRNA localization and translational control in *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(10):a012294.
355. Bruckenstein DA, Lein PJ, Higgins D, Fremeau RT, Jr. Distinct spatial localization of specific mRNAs in cultured sympathetic neurons. *Neuron*. 1990;5(6):809-19.
356. Sephton CF, Yu G. The function of RNA-binding proteins at the synapse: implications for neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(19):3621-35.
357. 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;429(21):3139-45.
358. Gavish-Izakson M, Velpula BB, Elkon R, Prados-Carvajal R, Barnabas GD, Ugalde AP, et al. Nuclear poly(A)-binding protein 1 is an ATM target and essential for DNA double-strand break repair. *Nucleic acids research*. 2018;46(2):730-47.
359. Kim HH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *Journal of nucleic acids*. 2010;2010:981487.
360. Carrier F, Gagnon A, Hollander MC, Jeang KT, Fornace AJ, Jr. Induction of RNA-binding proteins in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(4):1554-8.
361. Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *Embo j*. 2004;23(15):3092-102.
362. Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*. 2005;123(1):49-63.
363. Masuda K, Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, Lee EK, Tominaga K, et al. Global dissociation of HuR-mRNA complexes promotes cell survival after ionizing radiation. *Embo j*. 2011;30(6):1040-53.
364. Mastrocola AS, Kim SH, Trinh AT, Rodenkirch LA, Tibbetts RS. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2013;288(34):24731-41.

365. Rulten SL, Rotheray A, Green RL, Grundy GJ, Moore DA, Gomez-Herreros F, et al. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(1):307-14.
366. Krietsch J, Caron MC, Gagne JP, Ethier C, Vignard J, Vincent M, et al. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(20):10287-301.
367. Deshar R, Yoo W, Cho EB, Kim S, Yoon JB. RNF8 mediates NONO degradation following UV-induced DNA damage to properly terminate ATR-CHK1 checkpoint signaling. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(2):762-78.
368. Glorian V, Maillot G, Poles S, Iacovoni JS, Favre G, Vagner S. HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(11):1692-701.
369. Ding J, Lu B, Wang J, Wang J, Shi Y, Lian Y, et al. Long non-coding RNA Loc554202 induces apoptosis in colorectal cancer cells via the caspase cleavage cascades. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2015;34(1):100.
370. Bandyopadhyay S, Sengupta T, Fernandes D, Spicer E. Role of HuR in the post-transcriptional regulation of Bcl-2 expression in human HL60 leukemia cells. *Cancer Research.* 2007;67(9 Supplement):3174-.
371. Subasic D, Stoeger T, Eisenring S, Matia-Gonzalez AM, Imig J, Zheng X, et al. Post-transcriptional control of executioner caspases by RNA-binding proteins. *Genes Dev.* 2016;30(19):2213-25.
372. Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *The EMBO journal.* 2000;19(10):2340-50.
373. Zong FY, Fu X, Wei WJ, Luo YG, Heiner M, Cao LJ, et al. The RNA-binding protein QKI suppresses cancer-associated aberrant splicing. *PLoS Genet.* 2014;10(4):e1004289.
374. Das S, Anczukow O, Akerman M, Krainer AR. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell Rep.* 2012;1(2):110-7.
375. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet.* 2009;41(7):843-8.
376. Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet.* 2017;8:31.
377. Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* 2008;24(8):416-25.
378. Pereira B, Billaud M, Almeida R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer.* 2017;3(7):506-28.
379. Nishida K, Kuwano Y, Nishikawa T, Masuda K, Rokutan K. RNA Binding Proteins and Genome Integrity. *International journal of molecular sciences.* 2017;18(7):1341.
380. March ZM, King OD, Shorter J. Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res.* 2016;1647:9-18.

381. Nussbacher JK, Tabet R, Yeo GW, Lagier-Tourenne C. Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions. *Neuron*. 2019;102(2):294-320.
382. Zhou Y, Dong F, Mao Y. Control of CNS functions by RNA-binding proteins in neurological diseases. *Curr Pharmacol Rep*. 2018;4(4):301-13.
383. Heraud-Farlow JE, Kiebler MA. The multifunctional Staufen proteins: conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*. 2014;37(9):470-9.
384. Irion U, Adams J, Chang CW, St Johnston D. Miranda couples oskar mRNA/Staufen complexes to the bicoid mRNA localization pathway. *Dev Biol*. 2006;297(2):522-33.
385. Clark I, Giniger E, Ruohola-Baker H, Jan LY, Jan YN. Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol*. 1994;4(4):289-300.
386. Schupbach T, Wieschaus E. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Roux Arch Dev Biol*. 1986;195(5):302-17.
387. Li P, Yang X, Wasser M, Cai Y, Chia W. Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell*. 1997;90(3):437-47.
388. 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;62(1):113-8.
389. 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;36(3):527-9.
390. 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;42(12):7867-83.
391. 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;115(Pt 16):3285-95.
392. Zhang X, Trepanier V, Beaujois R, Viranaicken W, Drobetsky E, DesGroseillers L. The downregulation of the RNA-binding protein Staufen2 in response to DNA damage promotes apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(8):3695-712.
393. 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;19(3):2220-30.
394. Heber S, Gaspar I, Tants JN, Gunther J, Moya SMF, Janowski R, et al. Staufen2-mediated RNA recognition and localization requires combinatorial action of multiple domains. *Nat Commun*. 2019;10(1):1659.
395. Miki T, Takano K, Yoneda Y. The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct*. 2005;30(2):51-6.
396. Macchi P, Brownawell AM, Grunewald B, DesGroseillers L, Macara IG, Kiebler MA. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar

accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31440-4.

397. Miki T, Yoneda Y. Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem.* 2004;279(46):47473-9.

398. Maher-Laporte M, Berthiaume F, Moreau M, Julien LA, Lapointe G, Mourez M, et al. Molecular composition of staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain. *PLoS One.* 2010;5(6):e11350.

399. Park E, Maquat LE. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2013;4(4):423-35.

400. 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;14(2):324-35.

401. Maher-Laporte M, DesGroseillers L. Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains. *BMB Rep.* 2010;43(5):344-8.

402. Heraud-Farlow JE, Sharangdhar T, Li X, Pfeifer P, Tauber S, Orozco D, et al. Staufen2 regulates neuronal target RNAs. *Cell Rep.* 2013;5(6):1511-8.

403. Ortiz R, Georgieva MV, Gutierrez S, Pedraza N, Fernandez-Moya SM, Gallego C. Recruitment of Staufen2 Enhances Dendritic Localization of an Intron-Containing CaMKIIalpha mRNA. *Cell Rep.* 2017;20(1):13-20.

404. Sharangdhar T, Sugimoto Y, Heraud-Farlow J, Fernandez-Moya SM, Ehses J, Ruiz de Los Mozos I, et al. A retained intron in the 3'-UTR of Calm3 mRNA mediates its Staufen2- and activity-dependent localization to neuronal dendrites. *EMBO Rep.* 2017;18(10):1762-74.

405. Pernice HF, Schieweck R, Jafari M, Straub T, Bilban M, Kiebler MA, et al. Altered Glutamate Receptor Ionotropic Delta Subunit 2 Expression in Stau2-Deficient Cerebellar Purkinje Cells in the Adult Brain. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7).

406. 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.

407. Elvira G, Massie B, DesGroseillers L. The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem.* 2006;96(1):105-17.

408. Beaujouis R, Ottoni E, Zhang X, Gagnon C, Hassine S, Mollet S, et al. The M-phase specific hyperphosphorylation of Staufen2 involved the cyclin-dependent kinase CDK1. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):25.

409. Gleghorn ML, Gong C, Kielkopf CL, Maquat LE. Staufen1 dimerizes through a conserved motif and a degenerate dsRNA-binding domain to promote mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(4):515-24.

410. Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron.* 2001;32(3):463-75.

411. Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, et al. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):2100-5.

412. Jeong JH, Nam YJ, Kim SY, Kim EG, Jeong J, Kim HK. The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem.* 2007;102(6):2073-84.
413. Nam YJ, Cheon HS, Choi YK, Kim SY, Shin EY, Kim EG, et al. Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) docking sites on Staufen2 protein in dendritic mRNA transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(4):525-9.
414. Zeitelhofer M, Karra D, Macchi P, Tolino M, Thomas S, Schwarz M, et al. Dynamic interaction between P-bodies and transport ribonucleoprotein particles in dendrites of mature hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2008;28(30):7555-62.
415. Fritzsche R, Karra D, Bennett KL, Ang FY, Heraud-Farlow JE, Tolino M, et al. Interactome of two diverse RNA granules links mRNA localization to translational repression in neurons. *Cell Rep.* 2013;5(6):1749-62.
416. Belanger G, Stocksley MA, Vandromme M, Schaeffer L, Furic L, DesGroseillers L, et al. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurochem.* 2003;86(3):669-77.
417. Price TJ, Flores CM, Cervero F, Hargreaves KM. The RNA binding and transport proteins staufen and fragile X mental retardation protein are expressed by rat primary afferent neurons and localize to peripheral and central axons. *Neuroscience.* 2006;141(4):2107-16.
418. Miki T, Kamikawa Y, Kurono S, Kaneko Y, Katahira J, Yoneda Y. Cell type-dependent gene regulation by Staufen2 in conjunction with Upf1. *BMC Mol Biol.* 2011;12:48.
419. 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;110(2):405-12.
420. O'Leary DA, Sharif O, Anderson P, Tu B, Welch G, Zhou Y, et al. Identification of small molecule and genetic modulators of AON-induced dystrophin exon skipping by high-throughput screening. *PLoS One.* 2009;4(12):e8348.
421. Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, et al. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell.* 2005;16(1):405-20.
422. Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, et al. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol.* 2006;172(2):221-31.
423. Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, et al. Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn Mem.* 2011;18(5):314-26.
424. Popper B, Demleitner A, Bolivar VJ, Kusek G, Snyder-Keller A, Schieweck R, et al. Staufen2 deficiency leads to impaired response to novelty in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2018;150:107-15.
425. Berger SM, Fernandez-Lamo I, Schonig K, Fernandez Moya SM, Ehses J, Schieweck R, et al. Forebrain-specific, conditional silencing of Staufen2 alters synaptic plasticity, learning, and memory in rats. *Genome Biol.* 2017;18(1):222.
426. Bilogan CK, Horb ME. *Xenopus* staufen2 is required for anterior endodermal organ formation. *Genesis.* 2012;50(3):251-9.

427. 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;292(2):393-406.
428. Dash S, Siddam AD, Barnum CE, Janga SC, Lachke SA. RNA-binding proteins in eye development and disease: implication of conserved RNA granule components. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2016;7(4):527-57.
429. Cockburn DM, Charish J, Tassew NG, Eubanks J, Bremner R, Macchi P, et al. The double-stranded RNA-binding protein Staufen 2 regulates eye size. *Mol Cell Neurosci.* 2012;51(3-4):101-11.
430. Kusek G, Campbell M, Doyle F, Tenenbaum SA, Kiebler M, Temple S. Asymmetric segregation of the double-stranded RNA binding protein Staufen2 during mammalian neural stem cell divisions promotes lineage progression. *Cell Stem Cell.* 2012;11(4):505-16.
431. Vessey JP, Amadei G, Burns SE, Kiebler MA, Kaplan DR, Miller FD. An asymmetrically localized Staufen2-dependent RNA complex regulates maintenance of mammalian neural stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012;11(4):517-28.
432. Cao Y, Du J, Chen D, Wang Q, Zhang N, Liu X, et al. RNA-binding protein Stau2 is important for spindle integrity and meiosis progression in mouse oocytes. *Cell Cycle.* 2016;15(19):2608-18.
433. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(7):512-22.
434. Mukherjee N, Wessels H-H, Lebedeva S, Sajek M, Ghanbari M, Garzia A, et al. Deciphering human ribonucleoprotein regulatory networks. *Nucleic acids research.* 2019;47(2):570-81.
435. Blasina A, Hallin J, Chen E, Arango ME, Kraynov E, Register J, et al. Breaching the DNA damage checkpoint via PF-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(8):2394-404.
436. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2013;70(21):4009-21.
437. Petermann E, Woodcock M, Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(37):16090-5.
438. Rodriguez R, Meuth M. Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Molecular biology of the cell.* 2006;17(1):402-12.
439. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 2010;8:31-.
440. Yuan R, Vos HR, van Es RM, Chen J, Burgering BM, Westendorp B, et al. Chk1 and 14-3-3 proteins inhibit atypical E2Fs to prevent a permanent cell cycle arrest. *Embo j.* 2018;37(5).
441. Trimarchi JM, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998;95(6):2850-5.
442. Bertoli C, Klier S, McGowan C, Wittenberg C, de Bruin RA. Chk1 inhibits E2F6 repressor function in response to replication stress to maintain cell-cycle transcription. *Curr Biol.* 2013;23(17):1629-37.

443. Kouranti I, Peyroche A. Protein degradation in DNA damage response. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(5):538-45.
444. Brinkmann K, Schell M, Hoppe T, Kashkar H. Regulation of the DNA damage response by ubiquitin conjugation. *Front Genet.* 2015;6:98.
445. Michelena J, Gatti M, Teloni F, Imhof R, Altmeyer M. Basal CHK1 activity safeguards its stability to maintain intrinsic S-phase checkpoint functions. *The Journal of Cell Biology.* 2019;218(9):2865-75.
446. Clague MJ, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell.* 2010;143(5):682-5.
447. Pant V, Lozano G. Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev.* 2014;28(16):1739-51.
448. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005;6(1):79-87.
449. Millar AH, Heazlewood JL, Giglione C, Holdsworth MJ, Bachmair A, Schulze WX. The Scope, Functions, and Dynamics of Posttranslational Protein Modifications. *Annu Rev Plant Biol.* 2019;70:119-51.
450. Osorio-Zambrano WF, Davey S. Chk1 Activation Protects Rad9A from Degradation as Part of a Positive Feedback Loop during Checkpoint Signalling. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144434.
451. Chen M-S, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Chk1 Kinase Negatively Regulates Mitotic Function of Cdc25A Phosphatase through 14-3-3 Binding. *Molecular and Cellular Biology.* 2003;23(21):7488-97.
452. May DG, Roux KJ. BioID: A Method to Generate a History of Protein Associations. *Methods Mol Biol.* 2019;2008:83-95.
453. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, Lambert J-P, St-Denis NA, Li T, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data. *Nature Methods.* 2013;10:730.
454. Perez-Garijo A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;82:86-95.
455. Julien O, Zhuang M, Wiita AP, O'Donoghue AJ, Knudsen GM, Craik CS, et al. Quantitative MS-based enzymology of caspases reveals distinct protein substrate specificities, hierarchies, and cellular roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016:201524900.
456. Ono Y, Sorimachi H. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(1):224-36.
457. Santella L, Kyojuka K, De Riso L, Carafoli E. Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium.* 1998;23(2-3):123-30.
458. Vandenabeele P, Orrenius S, Zhivotovsky B. Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death And Differentiation.* 2005;12:1219.
459. Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 2002;12(1):46-54.
460. Zhu G, Briz V, Seinfeld J, Liu Y, Bi X, Baudry M. Calpain-1 deletion impairs mGluR-dependent LTD and fear memory extinction. *Scientific Reports.* 2017;7:42788.



461. Baudry M, Bi X. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2016;39(4):235-45.
462. Gilbertson S, Federspiel JD, Hartenian E, Cristea IM, Glaunsinger B. Changes in mRNA abundance drive shuttling of RNA binding proteins, linking cytoplasmic RNA degradation to transcription. *Elife.* 2018;7.
463. Shortt J, Johnstone RW. Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
464. Cookson MR. RNA-binding proteins implicated in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(1).
465. Castello A, Fischer B, Hentze MW, Preiss T. RNA-binding proteins in Mendelian disease. *Trends Genet.* 2013;29(5):318-27.
466. de Bruin RG, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ, van der Veer EP. Emerging roles for RNA-binding proteins as effectors and regulators of cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2017;38(18):1380-8.
467. Salem ESB, Vonberg AD, Borra VJ, Gill RK, Nakamura T. RNAs and RNA-Binding Proteins in Immuno-Metabolic Homeostasis and Diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:106.
468. Brinegar AE, Cooper TA. Roles for RNA-binding proteins in development and disease. *Brain research.* 2016;1647:1-8.
469. Liu G, Zhang Q, Xia L, Shi M, Cai J, Zhang H, et al. RNA-binding protein CELF6 is cell cycle regulated and controls cancer cell proliferation by stabilizing p21. *Cell Death & Disease.* 2019;10(10):688.
470. Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, Reumann K, Schwartz PE, Will H, et al. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene.* 2011;30(4):434-44.
471. Li T, Li S, Chen D, Chen B, Yu T, Zhao F, et al. Transcriptomic analyses of RNA-binding proteins reveal eIF3c promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2017;108(5):877-85.
472. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene.* 2008;27(20):2801-9.
473. Chaudhry MA, Chodosh LA, McKenna WG, Muschel RJ. Gene expression profiling of HeLa cells in G1 or G2 phases. *Oncogene.* 2002;21(12):1934-42.
474. Mittelman D, Wilson JH. The fractured genome of HeLa cells. *Genome biology.* 2013;14(4):111-.
475. Wang W. Regulatory RNA-binding proteins in senescence. *Ageing Res Rev.* 2012;11(4):485-90.
476. Collin G, Huna A, Warnier M, Flaman J-M, Bernard D. Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell death & disease.* 2018;9(3):259-.
477. Collin G, Huna A, Warnier M, Flaman J-M, Bernard D. Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell Death & Disease.* 2018;9(3):259.
478. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):209-20.

479. Lessard F, Igelmann S, Trahan C, Huot G, Saint-Germain E, Mignacca L, et al. Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):789-99.
480. Ma L, Chang N, Guo S, Li Q, Zhang Z, Wang W, et al. CSIG inhibits PTEN translation in replicative senescence. *Molecular and cellular biology.* 2008;28(20):6290-301.
481. Xie N, Ma L, Zhu F, Zhao W, Tian F, Yuan F, et al. Regulation of the MDM2-p53 pathway by the nucleolar protein CSIG in response to nucleolar stress. *Scientific reports.* 2016;6:36171-.
482. Kai M. Roles of RNA-Binding Proteins in DNA Damage Response. *International journal of molecular sciences.* 2016;17(3):310-.
483. 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;39(3):141-9.
484. Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. The Role of Long Non Coding RNAs in the Repair of DNA Double Strand Breaks. *Int J Mol Cell Med.* 2017;6(1):1-12.
485. Su M, Wang H, Wang W, Wang Y, Ouyang L, Pan C, et al. LncRNAs in DNA damage response and repair in cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018;50(5):433-9.
486. Rinn JL, Chang HY. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry.* 2012;81(1):145-66.
487. Lees-Miller SP, Beattie TL, Tainer JA. Noncoding RNA joins Ku and DNA-PKcs for DNA-break resistance in breast cancer. *Nature structural & molecular biology.* 2016;23(6):509-10.
488. Ferre F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction. *Brief Bioinform.* 2016;17(1):106-16.
489. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018;293(27):10512-23.
490. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol.* 2018;36(9):880-7.
491. Bell SD, Botchan MR. The minichromosome maintenance replicative helicase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a012807-a.
492. García-Muse T, Aguilera A. Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2016;17:553.

# Annexes