

Université de Montréal

Les différents rôles de STAUFEN1 dans les points de contrôle du cycle cellulaire tumoral vs non
tumoral

Par

Bellastrid Doran

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

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

Option: Dynamique cellulaire des complexes macromoléculaires

octobre 2020, dépôt final

© Bellastrid Doran, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Biochimie et médecine moléculaire

Ce mémoire intitulé

Les différents rôles de STAUFEN1 dans les points de contrôle du cycle cellulaire tumoral vs non tumoral

Présentée par

Bellastrid Doran

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Gerardo Ferbeyre
Président-rapporteur

Dr. Luc DesGroseillers
Directeur de recherche

Dr. Pierre Thibault
Membre du jury

RÉSUMÉ

STAUFEN1 (STAU1) est une protéine de liaison à l'acide ribonucléique (ARN) double brin jouant un rôle important dans le contrôle post-transcriptionnel de nombreux ARN messager (ARNm). Sa déplétion diminue la prolifération des cellules non cancéreuses en altérant les transitions G1/S et G2/M. En revanche, Ceci n'a aucun impact sur la prolifération des cellules tumorales. La déplétion de STAU1 module le niveau d'expression des transcrits et/ou des protéines impliquées dans la régulation des points de contrôle des transitions de phase. Notamment, STAU1 module le niveau d'expression de la protéine CDK4 ainsi que l'abondance de l'ARNm E2F1, deux régulateurs indispensables de la transition G1/S. Le transcrit de ces deux gènes possède un site de liaison à STAU1 ou STAU1 binding site (SBS) dans la région codante ou coding sequence (CDS) et dans la région non codante en 3' (3'UTR), respectivement. Cependant, l'importance de la liaison de STAU1 à ces transcrits n'a pas encore été étudiée. Étonnamment, la sensibilité des cellules non tumorales et tumorales à l'expression de STAU1 est inversée lors de la surexpression de STAU1. En effet, sa surexpression altère l'entrée en mitose des cellules cancéreuses et diminue leur prolifération, alors qu'elle n'a aucun effet sur la prolifération des cellules non tumorales. Lors de la mitose, STAU1 s'associe au fuseau mitotique (FM), ce qui lui permet de localiser des ARNm et de contrôler leur séquestration et/ou leur traduction locale. Cependant, le mécanisme qui permet à STAU1 de lier le FM est encore inconnu. Pour ce mémoire, nous avons donc poursuivi deux objectifs. Le premier but est de comprendre la régulation post-transcriptionnelle médiée par STAU1 des transcrits essentiels à la transition G1/S chez les cellules non tumorales. Notre hypothèse est que STAU1 par sa liaison directe à ses transcrits cibles via le SBS module leur expression. Pour ce faire, des cellules de type sauvage ou déplétées en STAU1 étaient transfectées par des plasmides exprimant les transcrits de CDK4 et d'E2F1 contenant un SBS endogène ou muté de telle sorte qu'il ne reconnaît plus STAU1. L'expression des protéines CDK4 et E2F1 est dosée par un essai luciférase ou un immunobuvardage de type western ou western blot (WB). Nous avons observé que STAU1 régule négativement et positivement l'expression endogène de CDK4 et d'E2F1, respectivement, ce qui contribue au passage de la transition G1/S, donc à la prolifération cellulaire non tumorale. Les essais luciférase ont confirmé

le rôle de STAU1 dans la régulation positive d'E2F1 lorsque liée au SBS dans le 3'UTR du transcrit E2F1. Malheureusement, les plasmides utilisés pour l'expression de CDK4 se sont avérés non fonctionnels, ce qui nous a forcés à mettre de côté cette expérience. Le deuxième but est d'étudier les déterminants qui régulent la localisation de STAU1 au FM chez les cellules tumorales. Pour ce faire, la localisation de STAU1 ou des mutants au FM est détectée par WB à partir de préparations des FM purifiés. Nos données montrent que le déterminant est composé de plusieurs acides aminés (aa) situés entre le 26^{ème} et 37^{ème} aa du côté N-terminal de la protéine STAU1. En somme, nos résultats montrent les différents rôles de STAU1 dans les cellules tumorales vs cellules non tumorales. De ce fait, STAU1 pourrait être une cible thérapeutique spécifique potentielle dans le traitement du cancer.

Mots-clés : STAU1, points de contrôle des phases du cycle cellulaire tumoral et non tumoral, CDK4, E2F1, mitose, transition G1/S

ABSTRACT

STAU1 (STAU1) is a double stranded RNA binding protein that plays an important role in the post-transcriptional control of many mRNAs. Its depletion decreases the proliferation of non-cancer cells by altering G1/S and G2/M transitions. In contrast, this has no impact on the proliferation of tumor cells. The decrease of STAU1 expression modulates the level of transcripts/proteins of several genes involved in phase transition checkpoints, including CDK4 and E2F1, two essential regulators in G1/S transition. In addition, CDK4 and E2F1 transcripts have a STAU1 binding site (SBS) in the coding sequence (CDS) and the non-coding region in 3' (3'UTR), respectively. However, the molecular consequence of STAU1 association with the SBS is not yet studied. Surprisingly, the sensibility of non-cancer and cancer cells to STAU1 expression is reversed following STAU1 overexpression. Indeed, its overexpression alters the entry into mitosis of cancer cells and decreases their proliferation, while it has no effect on non-cancer cells. During mitosis, STAU1 associates with the mitotic spindle, which allows it to localize mRNAs and other non-coding RNAs. STAU1 likely controls their sequestration and/or local translation during mitosis. However, the molecular determinant involved in STAU1-spindle association is still not known. Therefore, for this master thesis, we had two objectives. The first goal is to understand the post-transcriptional regulation mediated by STAU1 on transcripts that are essential for G1/S transition in non-tumor cells. Our hypothesis is that STAU1, by its direct binding to the SBS of its target transcripts, modulates their expression. To do this, plasmids coding for CDK4 and E2F1 containing a wild-type or mutated SBS that does not recognized STAU1 were transfected in wild-type and STAU1-depleted cells. Expression of CDK4 and E2F1 was detected by dual luciferase assay and western blot (WB). Our results first indicate that STAU1 negatively and positively regulates the endogenous expression of CDK4 and E2F1, respectively, which contributes to the passage of G1/S transition, and therefore to the proliferation non-tumor cells. Then, the luciferase assays confirm the role of STAU1 in E2F1 expression, depending on STAU1 binding to E2F1 SBS in its 3'UTR. Unfortunately, the plasmids used for CDK4 expression turned out to be non-functional. The second goal is to identify the molecular determinants responsible for the localization of STAU1 to the mitotic spindle in tumor cells. To this end, the localization of STAU1 or of several

mutants was measured by WB using purified spindle preparations. Our data show that the determinant is composed of several amino acids (aa) located between the 26th and 37th aa at the N-terminal end of STAU1. In summary, our results show the different roles of STAU1 in tumor and non-tumor cells. Therefore, STAU1 could be a potential specific therapeutic target in cancer treatments.

Keywords : STAU1, cell cycle phases checkpoints of tumor and non-tumor cells, CDK4, E2F1, mitosis, G1/S transition

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des figures	13
Liste des sigles et abréviations.....	15
Remerciements.....	19
INTRODUCTION.....	21
La régulation génique chez les eucaryotes	21
Les RBP.....	21
Les fonctions de STAU.....	26
<i>Les domaines fonctionnels de STAU1.....</i>	<i>27</i>
<i>Les rôles de STAU1 dans la cellule.....</i>	<i>28</i>
<i>Les rôles de STAU1 dans les pathologies.....</i>	<i>30</i>
L'interaction entre STAU1 et les ARNm	31
<i>STAU1 lie les ARNm dans leur région 3'UTR</i>	<i>32</i>
<i>STAU1 lie les ARNm dans leur région 5'UTR</i>	<i>33</i>
<i>STAU1 lie les ARNm dans leur région CDS.....</i>	<i>34</i>
<i>STAU1 lie les ribosomes</i>	<i>34</i>
<i>STAU1 module le niveau des ARNm régulateurs du cycle cellulaire.....</i>	<i>36</i>
Les rôles de STAU1 dans le cycle cellulaire	38
<i>La transition G1/S</i>	<i>38</i>
<i>Les rôles de CDK4 dans la cellule.....</i>	<i>39</i>

<i>Les rôles d'E2F1 dans la cellule</i>	40
<i>La transition de la mitose</i>	42
Les rôles de STAU1 sur le FM	43
<i>La localisation de STAU1 sur le FM</i>	43
<i>STAU1 participe à la maturation des ARNm sur le FM chez les cellules tumorales</i>	44
PROBLÉMATIQUES ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	49
Problématique	49
Hypothèses	50
Objectifs	50
RÉSULTATS	51
L'implication de STAU1 dans la transition G1/S du cycle cellulaire	51
<i>STAU1 régule l'expression des protéines essentielles à la transition G1/S</i>	51
La régulation de CDK4 par STAU1	53
La régulation d'E2F1 par STAU1.....	54
Les déterminants responsables de l'association de STAU1 au FM	57
DISCUSSION	63
STAU1 module l'expression d'ARNm codant pour des protéines essentielles à la transition G1/S du cycle cellulaire.....	63
<i>STAU1 module l'expression de CDK4</i>	63
<i>STAU1 module l'expression d'E2F1 par sa liaison au 3'UTR</i>	64
Chez les cellules non tumorales	64
Chez les cellules tumorales	65
Les déterminants responsables de l'association de STAU1 au FM	66
<i>L'importance du dsRBD2 dans la localisation de STAU1 au FM</i>	66

<i>La région permettant la localisation de STAU1 au FM.....</i>	67
<i>Les résidus spécifiques permettant la localisation de STAU1 au FM.....</i>	67
CONCLUSION.....	69
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	71
<i>La culture cellulaire</i>	71
<i>La transfection</i>	71
<i>L'infection.....</i>	71
<i>La quantification de STAU1 sur le FM</i>	72
<i>WB</i>	73
<i>Le clonage des plasmides exprimant CDK4</i>	74
<i>Le clonage des constructions de luciférase</i>	74
<i>La quantification de la luciférase</i>	74
Références bibliographiques	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1. –	La représentation schématique de STAU1 chez l’ <i>homo sapiens</i>	27
Figure 2. –	La représentation schématique de STAU chez la <i>drosophile</i>	27
Figure 3. –	L’alignement de la région conservée dans la boucle d’insertion du dsRBD2	28
Figure 4. –	Le co-fractionnement de STAU ⁵⁵ endogène et des ribosomes	35
Figure 5. –	Une accumulation de cellules en phase G1 en absence de STAU1	37
Figure 6. –	La déplétion de STAU1 empêche l’entrée en phase S	37
Figure 7. –	La déplétion de STAU1 module l’expression génique des régulateurs du cycle cellulaire	38
Figure 8. –	La quantification de l’expression de STAU1 endogène par RT-qPCR.	42
Figure 9. –	La localisation de STAU1 sur le FM	44
Figure 10. –	Les transcrits enrichis sur les FM dans les cellules HCT116	47
Figure 11. –	La Localisation d’ARN médiée par STAU1 sur le fuseau mitotique	48
Figure 12. –	La Localisation d’ARN médiée par STAU1 sur le fuseau mitotique	52
Figure 13. –	La régulation de STAU1 sur l’ARNm CDK4 et E2F1	53
Figure 14. –	STAU1 module l’expression de CDK4	54
Figure 15. –	Le 3’UTR d’E2F1 contient des éléments de régulation dépendants de STAU1	55
Figure 16. –	STAU1 module l’expression d’E2F1 par sa liaison au SBS dans le 3’UTR	56
Figure 17. –	Le domaine dsRBD2 est nécessaire pour la localisation de STAU1 au FM	58
Figure 18. –	Le dsRBD2 est suffisant pour la localisation de STAU1 au FM	59
Figure 19. –	Les aa 26 à 37 du côté N-terminal de STAU1 sont impliqués dans la localisation au FM	61
Figure 20. –	La recherche des résidus importants pour l’association de STAU1 au FM	62
Figure 21. –	Les fonctions spécifiques de STAU1 dans les cellules tumorales vs non tumorales	70
Figure 22. –	Le schéma du plasmide dérivé du vecteur pCDNA ₃ RSV renfermant le gène de STAU1	73

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

3'UTR : région non codante en 3'

5'UTR : région non codante en 5'

aa : acide aminé

ALS : sclérose latérale amyotrophique ou amyotrophic lateral sclerosis

APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome

APC2 : polypose adénomateuse coli 2 ou Adenomatous polyposis coli 2

ARMS : cellule rhabdomyosarcomeuse alvéolaire

ARNInc : ARN long non codant

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNsno : petit ARN nucléolaire

ARNv : ARN viral

ASE : événement d'épissage alternatif ou alternative splicing event

CAT1 : transporteur d'acide aminé cationique 1 ou cationic amino acid transporter 1

CD : cycline de type D

CDK : kinase dépendante de la cycline ou cyclin-dependent kinases

CDS : région codante ou coding sequence

CKI : inhibiteurs de CDK

DM : dystrophie myotonique

DM1 : DM de type I

DMPK : dystrophie myotonique protéine kinase ou dystrophia myotonica protein kinase

dsRBD : domaine de liaison à l'ARN double brin ou double-stranded RNA-Binding Domain

ERMS : cellule rhabdomyosarcomeuse embryonnaire

ESC : cellule souche embryonnaire ou embryonic stem cell

FACS : cytométrie en flux

Fluc : Firefly luciférase

FM : fuseau mitotique

FPKM : Fragments par kilobase de transcription par million de lectures mappées

GFP : protéine verte fluorescente ou green fluorescent protein

IN : extrait cellulaire total ou input

INSR : récepteur d'insuline ou insulin receptor

IP : Immunoprécipitation

IRAlu : élément Alu répété inversé

KO : cellule délétée en STAU1 ou STAU1 knock out

L-LTP : potentialisation à long terme induite chimiquement ou the late form of chemically induced long-term potentiation

miARN : micro-ARN

mTOR : cible mécaniste de la rapamycine ou mechanistic target of rapamycin

NF : facteur nucléaire ou nuclear factor

NMD : dégradation de l'ARNm non-sens ou nonsense-mediated mRNA decay

NSC : cellule souche neurale ou neural stem cell

PKR : protéine kinase R

pRB : protéine de rétinoblastome

pré-ARNm : précurseur d'ARN messenger

pré-ARNr : ARN précurseur ribosomique

RBD : domaine de liaison à l'ARN ou RNA-binding domain

RBP : protéine de liaison à l'ARN ou RNA-binding protein

Rluc : Renilla luciférase

RNP : ribonucléoprotéine

SBS : site de liaison à STAU1 ou STAU1 binding site

shNT : cellule témoin exprimant de shARN qui n'est pas une cible spécifique

SHRNP : complexe RNP-STAU1

shS1 : cellule dont l'expression de STAU1 est inhibée par shARN

siNT : cellule témoin exprimant de siARN qui n'est pas une cible spécifique

siS1 : cellule dont l'expression de STAU1 est inhibée par siARN

SMD : dégradation de l'ARNm médié par STAU ou STAU-mediated mRNA decay

STAU1 : STAUFEN1

TBD : domaine de liaison à la tubuline ou tubuline binding domain

UPS : système ubiquitine-protéasome ou ubiquitin-proteasome system

VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1

WB : immunobuvardage de type western ou western blot

WT : cellules sauvages ou wild type

ZBP-1 : protéine de liaison au code postal-1 ou Zipcode-binding protein-1

Δ : délétion

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr. Luc DesGroseillers qui m'a accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire alors que j'étais une jeune étudiante sans expérience en recherche. Il m'a guidé et supporté, à la fois académiquement et moralement tout au long de mon parcours.

J'ai également une profonde reconnaissance pour les membres du laboratoire du Dr. Gerardo Ferbeyre qui m'ont partagé leur connaissance et du matériel afin que je puisse compléter mes expériences.

J'ai débuté au laboratoire de Dr. Luc DesGroseillers lors d'un stage d'été, que j'ai adoré! Tellement, que j'ai continué en tant que stagiaire à temps partiel durant mon année scolaire. J'ai énormément apprécié le partage de savoir-faire entre les membres du laboratoire et l'environnement bienveillant et cordial qui m'ont permis d'être débrouillarde, de développer ma confiance ainsi que mon esprit critique et scientifique. Cela cultivait une passion en moi et me poussait à poursuivre une maîtrise. Un immense merci à Yulemi Gonzalez Quesada, ma superviseuse de stage qui, avec beaucoup de patience, m'a pris sous mon aile et m'a enseigné des techniques et astuces entourant le travail dans un laboratoire de recherche et qui m'a assisté et veillé à mon bien. Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon laboratoire, tout particulièrement Lionel Condé et Florence Bonnet-Magnaval, qui m'ont aidé autant avec mes projets au laboratoire que mes travaux académiques. Ils m'ont encouragé durant les temps difficiles, m'ont soutenu et m'ont donné des idées et suggestions pour la réussite de mes projets.

Finalement, j'aimerais exprimer mon immense gratitude pour ma famille et mes amis qui m'ont été un appui moral et émotionnel durant mes années d'étude. Leur support m'a permis de compléter mon parcours avec succès.

INTRODUCTION

La régulation génique chez les eucaryotes

L'expression des gènes est plus complexe chez les eucaryotes que chez les bactéries, mais les mêmes principes de base s'appliquent (1). Bien que l'expression des gènes eucaryotes est contrôlée principalement au niveau de la transcription qui détermine la quantité d'ARNm produite à partir d'un gène particulier, la régulation post-transcriptionnelle génique régulant la traduction de l'ARNm en protéines est aussi fondamentale pour une coordination de contrôle plus fin (2). La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes joue un rôle important dans divers processus cellulaires tels que le développement, le métabolisme et la progression du cancer (2). Plusieurs études affirment que la régulation post-transcriptionnelle est un réseau complexe et polyvalent. Ce réseau est contrôlé par des protéines spécifiques de liaison à l'ARN et/ou des ARN non codants, qui se lient à une séquence spécifique ou à des éléments structurels dans les ARN et régulent ainsi des sous-ensembles d'ARNm qui codent en partie des protéines liées fonctionnellement (2). Les protéines de liaison à l'ARN ou RNA-binding proteins (RBP) sont ainsi des régulateurs clés dans les fonctions cellulaires.

Les RBP

Les RBP sont généralement considérées comme des protéines qui se lient à l'ARN via un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN, comme le motif de reconnaissance de l'ARN, les domaines de liaison à l'ARN ou RNA-binding domains (RBD), les domaines à doigts de zinc, le domaine d'homologie ribonucléoprotéine (RNP) nucléaire hétérogène, et bien d'autres. Cette liaison détermine le destin et/ou la fonction des ARN cibles (3). Les RBP sont essentielles à la régulation de l'expression post-transcriptionnelle génique. Elles sont impliquées dans le métabolisme de l'ARN à toutes les étapes, y compris la transcription, l'épissage/épissage alternatif, la polyadénylation, l'exportation nucléaire, la localisation subcellulaire, la stabilisation, l'édition, la traduction, la dégradation, l'autorégulation ainsi que le traitement des ARNm et aussi des micro-ARN (miARN) (4).

Des RBP contribuent à la formation du complexe de ribonucléoprotéines qui sont principalement impliquées dans l'expression des gènes. Les complexes ribonucléoprotéiques sont des formes fonctionnelles dans lesquelles les précurseurs d'ARNm (pré-ARNm) et les ARNm se retrouvent dans les cellules. Les composants protéiques des ribonucléoprotéiques participent à la maturation des pré-ARNm (5). La liaison des ribonucléoprotéines nucléaires aux pré-ARNm peut déclencher l'initiation de la traduction des pré-ARNm naissants (5). Souvent, les ribonucléoprotéines restent liées aux ARNm matures jusqu'aux ribosomes, et font la navette entre le noyau et le cytoplasme pour engager la machinerie de traduction (5). En plus, les RBP sont aussi des déterminants importants de la localisation des ARNm (6).

Les RBP constituent des composantes importantes des grands complexes ARN/protéine qui permettent le transport des ARN localisés. Les RBP sont utilisées pour localiser les ARN dans différentes espèces. La protéine de liaison au code postal-1 ou Zipcode-binding protein-1 est une RBP identifiée dans les fibroblastes de poulet qui est liée au signal de localisation de l'ARNm de la β -actine (6). Il y a aussi la protéine homologue de *Xenopus*, Vera, qui se lie aux signaux de localisation de l'ARNm de Vg1 dans les ovocytes (6). Certaines RBP interviennent dans la localisation de l'ARN dans différents types de cellules au sein d'une espèce. Ainsi, STAU, une protéine qui se lie à l'ARN double brin, a été identifiée pour son rôle dans la localisation des ARN maternels dans l'ovocyte de la drosophile, et elle est également nécessaire pour localiser l'ARNm prospero dans les neuroblastes embryonnaires (6). En plus d'être essentielles à la localisation des ARN, les RBP permettent aussi le transport des ARN (7).

Les RBP peuvent autant se trouver dans les régions nucléaires que dans les régions cytoplasmiques. Ceci montre leur implication dans le métabolisme de l'ARN associé à ces compartiments (7). Dans le noyau, les RBP s'associent à des pré-ARNm, à des ARN nucléaires hétérogènes et à de l'ARNm mature pour leur exportation vers le cytoplasme. L'exportation des ARNm dans le cytoplasme est une étape fondamentale dans les processus de régulation des gènes, dont la qualité est méticuleusement contrôlée par des mécanismes très efficaces dans les cellules eucaryotes (7). La régulation de l'affinité des RBP pour des récepteurs de transport nucléo-cytoplasmique ainsi que leur faible interaction avec la protéine du panier nucléaire (Mlp1 ou Tpr) sont les exigences minimales pour distinguer et trier les ARNm aberrants. Il a été montré

que l'affinité entre les Tpr et les RBP est optimisée pour maximiser la rétention des ARNm aberrants (7). Mis à part de faciliter un certain nombre d'événements de traitement d'ARNm dans la cellule, de nombreuses RBP spécifiques aux cellules sont essentielles à la régulation du développement (4).

Les RBP sont hautement régulées au cours du développement pour contrôler les fonctions nucléaires et cytoplasmiques. Les deux fonctions sont perturbées dans les maladies qui affectent les activités des protéines codées par des ARNm cibles des RBP. Il a été montré que les changements dans l'abondance et la localisation des RBP, CELF et MBNL, favorisent les transitions d'épissage globales au cours du développement (8). Les niveaux de protéines CELF et MBNL cytoplasmiques sont élevés dans le muscle squelettique embryonnaire de souris. Les niveaux de protéines CELF diminuent tandis que MBNL se localise dans le noyau pendant le développement postnatal (8). Les niveaux de protéines CELF diminuent également pendant le développement postnatal du cœur de souris tandis que les niveaux de protéines MBNL augmentent (8). Les gènes subissant la transition d'épissage développemental sont enrichis pour le trafic vésiculaire et l'expression de CELF1 induite chez les souris transgéniques ramène un sous-ensemble de gènes du trafic vésiculaire au patron d'épissage fœtal (9). La réexpression de CELF1 chez les souris transgéniques adultes spécifiquement dans les cardiomyocytes entraîne une modification de la structure des tubules T et une manipulation mal régulée du calcium compatible avec les altérations associées à la réexpression des patrons d'épissage fœtal (9). Il a été aussi montré que les MBNL maintiennent l'état différencié des cellules dans le cerveau et les muscles, en réprimant le modèle d'épissage alternatif des cellules souches embryonnaires ou embryonic stem cells (ESC) (10). Les RBP de type muscleblind, MBNL1 et MBNL2, sont classifiées comme des régulateurs négatifs d'un large programme d'événements d'épissage alternatif. Cela permet la régulation différentielle entre les ESC et d'autres types de cellules. La suppression des MBNL dans les cellules différenciées provoque le passage à un modèle d'épissage alternatif de type ESC, tandis que la surexpression de MBNL dans les ESC favorise des modèles d'épissage alternatif de type cellules différenciées (10). Parmi ces cibles, les MBNL régulent un commutateur d'épissage alternatif spécifique aux ESC dont le facteur de transcription de la famille forkhead, FOXP1 qui contrôle la pluripotence (11). Les MBNL jouent un rôle de régulateur central et négatif dans la pluripotence,

leur délétion améliore donc significativement l'expression des gènes clés de la pluripotence et la formation de cellules souches pluripotentes induites lors de la reprogrammation des cellules somatiques (10). Ainsi, la perturbation des RBP peut mener à certaines pathologies.

Les RBP sont en interaction dynamique avec des protéines et des ARN au sein de complexes transitoires. La perturbation de l'association-dissociation appropriée de ces complexes conduit à la pathogénèse (12). Le TDP-43 ainsi que d'autres RBP ont des effets sur la sclérose latérale amyotrophique ou amyotrophic lateral sclerosis (ALS) qui est une maladie neurodégénérative affectant les motoneurones, ce qui entraîne une perte progressive de la fonction musculaire (12). La perte de TDP-43 entraîne l'inclusion d'exons cryptiques non conservés conduisant à une dégradation des ARN cibles d'épissage de TDP-43 (13). De plus, TDP-43 forme des granules cytoplasmiques d'ARNm qui subissent un transport bidirectionnel dépendant des microtubules dans les neurones in vitro et in vivo facilitant la livraison de l'ARNm cible aux compartiments neuronaux distants. Des mutations dans TDP-43 altèrent cette fonction de transport d'ARNm in vivo et in vitro, y compris dans les motoneurones dérivés de cellules souches de patients ayant l'ALS (12). Cela met en évidence que la dérégulation des RBP peut entraîner des pathogénités (13). La dérégulation des RBP est aussi impliquée dans de nombreuses autres maladies. Par exemple, la dérégulation de la RBP, FMR1 est la cause du syndrome du X fragile, la forme la plus courante de retard mental héréditaire. La RBP, CELF fait partie intégrante du développement normal du cœur et des muscles squelettiques et de la pathologie de la dystrophie myotonique (DM) (4). En plus, les RBP interagissent aussi avec les miARN primaires, précurseurs et matures, ce qui influence les niveaux des miARN matures affectant à leur tour les aspects critiques du développement et de la maladie (14).

Il est observé que 92% des RBP interagissent directement avec au moins un locus de miARN, et que certaines interactions sont spécifiques à la lignée cellulaire malgré l'expression du locus du miARN dans différentes lignées cellulaires. Il est montré que les RBP, ILF3 et BUD13 interagissent directement et stabilisent miR-144 et que la RBP BUD13 interrompt la maturation du miR-210. La RBP, DDX3X régule miR-20a primaire, tandis que la RBP LARP4 stabilise le précurseur miR-210 (14). Plus précisément, les RBP sont au cœur des mécanismes de régulation qui influencent la liaison des miARN à ses ARNm cibles. L'association des RBP aux ARNm cibles,

via une entrave stérique, peut interférer avec la liaison au complexe RISC (15). Il est montré que la RPB, HuR se lie aux éléments riches en AU dans le 3'UTR du transporteur d'acide aminé cationique 1 ou cationic amino acid transporter 1 (CAT1), et bloque la liaison au complexe RISC empêchant la dégradation de l'ARNm. Lors de la dissociation de HuR, CAT1 est libre d'interagir avec miR-122, ce qui provoque la répression traductionnelle de CAT1 (15). Alternativement, la dissociation de RBP de ses ARNm cibles peut également entraîner des changements dans la structure secondaire des ARNm, les protégeant de l'interaction avec RISC (15). Cela montre que les RBP régulent l'expression de nombreux ARNm, donc le niveau de plusieurs protéines dans la cellule, ce qui suggère des rôles dans le cycle cellulaire.

Dans les cellules humaines, la progression à travers le cycle cellulaire nécessite l'expression périodique de plus que 850 gènes, qui sont coordonnés par des programmes de transcription spécifiques à chaque phase (16). Le contrôle transcriptionnel de la transition G1/S est bien étudié. Un des meilleurs exemples est celui qui met en jeu des membres de la famille des facteurs de transcription E2F. Les facteurs E2F assurent l'activation de l'expression des gènes nécessaires à l'entrée de la phase S et à la synthèse de l'ADN (17). Cependant, les événements correspondant au contrôle de la transition G2/M sont moins bien compris (18). Il est bien connu que ces gènes sont contrôlés par des programmes spécifiques de transcription. Cependant, le mécanisme de transcription n'est pas assez fin pour permettre l'expression coordonnée de gènes de façon temporelle et spatiale au moment précis où la cellule en a de besoin. Des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle permettent un meilleur contrôle de ces programmes de transcription. La régulation des gènes par la régulation post-transcriptionnelle est moins bien connue (18). Des chercheurs ont identifié 39 RBP qui sont en corrélation significative avec les ARNm du cycle cellulaire (18). Ils ont constaté que les facteurs nucléaires ou nuclear factors (NF) 45 et 90 qui sont respectivement codés par les gènes ILF2 et ILF3 jouent des rôles essentiels dans la mitose. Une analyse du transcriptome révèle que NF45 et NF90 sont nécessaires pour l'expression d'un sous-ensemble d'ARNm mitotiques. Des études protéomiques ont montré que les protéines STAU1, STAU2 et UPF1 sont des interacteurs de proximité de NF45 et NF90. Ces protéines sont des composantes d'un mécanisme de dégradation de l'ARNm médié par STAU ou STAU-mediated mRNA decay (SMD). Elles jouent un rôle important dans la progression mitotique

favorisant la transition G2/M ainsi que la stabilité génomique (18). La déplétion des composantes du SMD augmente la liaison des ARNm mitotiques au complexe NF45-NF90, ce qui réchappe les cellules des défauts mitotiques (18). Ces résultats démontrent l'importance des RBP dans la transition des phases du cycle cellulaire.

En somme, l'association entre les RBP et leurs ARN cibles à n'importe quelle étape de la maturation et des fonctions des ARN est très dynamique et peut avoir des conséquences variées selon le contexte cellulaire dans lequel ils se trouvent (4). Dans, notre étude, nous nous intéressons particulièrement à la RBP, STAU1.

Les fonctions de STAU

Il existe deux paralogues de la protéine STAU chez l'humain, STAU1 et STAU2. Cette famille consiste en des protéines de liaison à l'ARN double brin. Elles ont la capacité de contrôler le destin des ARNm qui leur sont liés en s'impliquant dans plusieurs facettes de leur maturation (19,20).

STAU2 est impliquée dans la différenciation cellulaire et la plasticité synaptique des neurones (21,22). Il est aussi connu que STAU2 lie de nombreux ARNm codants pour les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et/ou l'apoptose. La régulation négative de STAU2 augmente les dommages à l'ADN et facilite l'apoptose, ce qui fait d'elle une protéine anti-apoptotique impliquée dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome (20). D'autre part, le paralogue STAU1 s'engage plutôt dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la différenciation (19).

Dans cette étude, nous nous concentrons plus particulièrement sur STAU1 qui est une protéine régulatrice clé de plusieurs fonctions essentielles de la cellule. STAU1 est omniprésente chez les mammifères sous différents isoformes protéiques de 55 kDa (STAU1⁵⁵ et STAU1⁵⁵ⁱ) et de 63 kDa (STAU1⁶³) générés par l'épissage alternatif (23). STAU1 possède plusieurs domaines permettant l'interaction avec des ARNm et des protéines. Elle est responsable de plusieurs fonctions indispensables dans la cellule. Entre autres, STAU1 est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle d'expression génique en participant au transport, à la localisation, à la dégradation, à l'épissage alternatif, à la traduction et à la stabilisation de ses transcrits cibles.

Ainsi, elle est connue comme un régulateur clé de la régulation génique fine dans les cellules humaines (19).

Les domaines fonctionnels de STAU1

Structurellement, STAU1 est constituée de quatre domaines de liaison à l'ARN double brin ou double-stranded RNA-binding domains (dsRBD), y compris dsRBD2, dsRBD3, dsRBD4 et dsRBD5 (figure 1). STAU1 renferme aussi un domaine de liaison à la tubuline ou tubuline binding domain (TBD) situé entre le dsRBD4 et le dsRBD5. Le TBD est impliqué dans le transport de l'ARNm sur le cytosquelette (24). Les dsRBD3 et dsRBD4 de STAU1 interagissent directement avec l'ARNm, ce qui permet leur transport. Néanmoins, bien que les dsRBD5 et dsRBD2 soient incapables de lier l'ARN, ils sont importants pour des interactions protéine-protéine (24). Chez STAU de la drosophile, le dsRBD5 a un rôle d'activateur de la traduction de l'ARNm une fois que ce dernier est bien localisé. De même, le dsRBD2 n'interagit pas avec l'ARNm puisqu'il est tronqué en deux portions par une boucle riche en proline et en acides aminés aromatiques. Ce domaine est cependant nécessaire pour la localisation de l'ARNm oskar aux microtubules de l'ovocyte (25) (figure 2). En absence de la boucle d'insertion, le dsRBD2 est compétent de lier l'ARNm oskar, mais il perd la capacité d'interagir avec les microtubules. De plus, comme montrée dans la figure 3, cette boucle est très conservée entre les espèces, suggérant donc son importance au fonctionnement de la protéine STAU1 humaine (25).



Figure 1. – La représentation schématique de STAU1 chez l'homo sapiens (19)

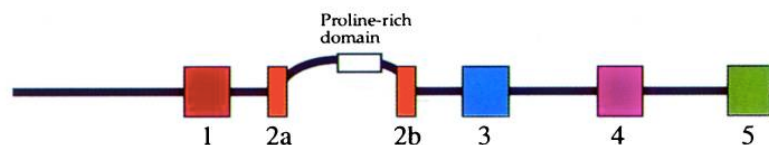


Figure 2. – La représentation schématique de STAU chez la drosophile (25)

GQRPFPPKFPSRFALPPPL	D.mel
HQRPFAPKYQSRYPALAPAL	D.vir
RGGHYACYPVLPPhMMAA	M.dom
RGGAYPPRYFYFPFVPPLL	Mouse
RGGAYPPRYFYFPFVPPP	Human
SMALYAPPFPTLPIDPARP	C.ele
YPPkY _r ^D F _f ^{P1} PP 1	Consensus

Figure 3. – L'alignement de la région conservée dans la boucle d'insertion du dsRBD2 (25)

Cette boucle est située entre le 27ème et le 43ème aa du côté N-terminal de STAU1 chez l'humain.

Les rôles de STAU1 dans la cellule

STAU1 est présente dans les corps cellulaires et prolongements dendritiques des neurones. Elle est engagée dans le transport et/ou la formation des granules d'ARNm le long des dendrites. Par cette fonction, STAU1 joue un rôle fondamental dans la régulation de la force synaptique et le maintien des changements de connectivité fonctionnelle sous-jacente à l'apprentissage et la mémoire (26). La régulation négative de STAU1 altère la forme tardive de potentialisation à long terme induite chimiquement ou the late form of chemically induced long-term potentiation (L-LTP) sans affecter la LTP précoce. Cette régulation négative de STAU1 diminue l'amplitude et la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs miniatures. Cela montre que STAU1 joue un rôle dans le maintien de l'efficacité des synapses hippocampiques. Au niveau cellulaire, la déplétion de STAU1 provoque le changement de la forme des épines synaptiques de régulière à allongée. Mais, ceci ne modifie pas la densité des épines. Le changement de forme des épines est restauré par l'expression de STAU1⁵⁵. Ces résultats montrent que STAU1 est important pour le transport d'ARNm dans les dendrites, soit des ARNm essentiels dans la régulation de la force synaptique et le maintien des changements de connectivité fonctionnelle sous-jacents à l'apprentissage et à la mémoire dépendant de l'hippocampe (26). De plus, STAU1 est aussi impliquée dans la réponse au stress (27).

Lorsque les cellules sont soumises au stress causé par un blocage d'initiation de la traduction, au stress du réticulum endoplasmique ou au stress oxydatif, STAU1 est recrutée vers les granules de stress. Mais, il est observé que STAU1 n'est pas un composant essentiel des granules de stress, et que sa déplétion favorise la formation de ces granules. La surexpression de STAU1 altère la formation des granules de stress (27). L'étude montre que STAU1 a une capacité inhibitrice de la formation des granules de stress en stabilisant les polysomes, ce qui fait basculer

l'équilibre polysomes-stress-granules en faveur du désassemblage de ces granules (27). En plus d'être impliquée dans la réponse cellulaire au stress, STAU1 joue aussi un rôle dans le cancer (28).

Les rhabdomyosarcomes sont des tumeurs musculaires squelettiques qui ont lieu généralement dans les cellules précurseurs du tissu musculaire (29). Ces tissus sarcomateux expriment des facteurs clés de régulation myogénique (28). Chez ces tissus, le développement de la prolifération reste bloqué, les cellules étant incapables de sortir du cycle cellulaire pour fusionner en myotubes (28). Les chercheurs ont découvert que STAU1 joue un rôle clé dans la différenciation myogénique par la régulation de la traduction du c-myc (28). c-myc est un proto-oncogène qui dimérise avec son partenaire de liaison Max pour stimuler l'expression des gènes cibles oncogènes provoquant la prolifération indéfinie des cellules cancéreuses (30). STAU1 augmente l'expression de c-myc grâce à un mécanisme de traduction en se liant au 5'UTR de son ARNm. Une augmentation de c-myc, à son tour, retarde la sortie du cycle cellulaire, provoquant ainsi une différenciation altérée (31). Il a été montré que STAU1 est nettement régulée à la hausse dans les tumeurs et les lignées cellulaires de rhabdomyosarcome humain par rapport au muscle squelettique normal (28). Il a été aussi observé que STAU1 favorise la tumorigenèse des sous-types de rhabdomyosarcome embryonnaire et alvéolaire à la fois dans la culture cellulaire et dans les modèles animaux (28). La déplétion de STAU1 provoque une diminution de prolifération ($P < 0,01$) par rapport aux contrôles chez les cellules rhabdomyosarcomeuses embryonnaires (ERMS) (28). De l'autre côté, STAU1 protège les cellules rhabdomyosarcomeuses alvéolaires (ARMS) de l'apoptose. Ces résultats montrent que STAU1 a plusieurs fonctions dans l'ERMS et l'ARMS par le contrôle des voies prolifératives et apoptotiques, respectivement (28). En plus, STAU1 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire dans diverses lignées cellulaires cancéreuses, y compris HCT116, U2OS et HEK293T et dans les cellules non tumorales (32). Cela suggère que STAU1 participe à la prolifération cellulaire (19).

La surexpression de STAU1 altère l'entrée en mitose et diminue la prolifération des cellules tumorales (19). Étonnamment, cela n'a aucun effet sur la prolifération des cellules non tumorales (32). En revanche, sa déplétion cause une réduction de la prolifération chez les cellules non cancéreuses en altérant les transitions G1/S et G2/M (32). Il est connu que STAU1 lie plusieurs ARNm et influence ainsi l'expression de leurs protéines qui sont des facteurs essentiels des

transitions de phase. Ceci mène à suggérer que STAU1 joue un rôle important dans la progression du cycle cellulaire (32,33).

Les rôles de STAU1 dans les pathologies

Il est connu que STAU1 est impliquée dans le transport de l'ARNm incorporé au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et à d'autres classes de virus à ARN (34). STAU1 interagit directement avec les VIH-1, Gag. Elle assure la sélection et l'encapsidation de l'ARN viral (ARNv) dans les particules du virus descendant. STAU1 forme un complexe RNP avec l'ARNv et Gag. Ce complexe existe également dans les cellules et constitue de nouveaux RNP STAU1 (SHRNP) dont l'assemblage est strictement dépendant de l'expression du VIH-1. Les SHRNP sont stables. La déplétion de STAU1 a entraîné une réduction des taux de Gag et une dérégulation de l'assemblage des virions nouvellement synthétisés. Les virions sont constitués d'ARNv, de STAU1 et d'autres protéines cellulaires (34). Ceci montre que STAU1 participe aux mécanismes d'interaction entre le virus et la cellule hôte. En plus d'être impliquée dans l'infection virale, STAU1 joue aussi un rôle dans certaines pathogénèses (26).

Il a été rapporté que STAU1 agit comme un modulateur dans la DM de type 1 (DM1), une maladie neurodégénérative (35). Dans cette maladie, le gène dystrophie myotonique protéine kinase ou dystrophia myotonica protein kinase (DMPK) contient une insertion de répétitions CUG ce qui cause une accumulation nucléaire de l'ARNm DMPK et la séquestration pathologique de RBP telles que MBNL1 et RBFOX1 (35,36). La séquestration de ces RBP modifie le patron d'épissage alternatif de plusieurs gènes incluant des facteurs de transcription et de nombreux facteurs d'épissage (35). Les membres de la famille des MBNL (MBNL1-3) sont responsables de la majorité des défauts d'épissage dans la DM1, et de la moitié des événements d'épissage contrôlés par MBNL1 et co-régulés par RBFOX1. Une régulation négative de l'activité de RBFOX1 dans les tissus DM1 mène à plusieurs altérations d'épissage (36). Il est remarqué que STAU1 influence une proportion similaire d'événements d'épissage alternatif ou alternative splicing events (ASE) que MBNL1 et RBFOX1, ce qui montre que STAU1 est un puissant régulateur d'épissage. Plusieurs événements d'épissage se sont avérés être co-régulés par les trois régulateurs d'épissage (STAU1, MBNL1 et RBFOX1), mais ce chevauchement n'est pas absolu. Ceci suggère que STAU1 régule un ensemble spécifique d'ASE. Parmi les cibles qui se chevauchent, il y a une proportion en équilibre

(~60 / 40) d'ASE où STAU1 influence les décisions d'épissage de la même manière ou dans la direction opposée à MBNL1 ou RBFOX1. Cela suggère que STAU1 peut fonctionner comme un agoniste ou un antagoniste d'autres facteurs d'épissage dans DM1 (35). STAU1 régule aussi l'inclusion de l'exon 11 du récepteur d'insuline ou insulin receptor (INSR) humain par une interaction avec des éléments Alu situés dans l'intron. La surexpression de STAU1 a la capacité d'inverser les défauts d'épissage causés par la séquestration des facteurs d'épissage dans la maladie. Elle peut restaurer le défaut d'épissage de l'exon 11 de l'INSR et l'événement de rétention intronique dans le pré-ARNm du canal chlorure (CLC1) (37). En plus, la surexpression de STAU1 favorise aussi l'exportation nucléo-cytoplasmique et la traduction des protéines dont l'ARNm est normalement retenu au noyau dans la maladie à la fois dans la culture cellulaire DM1 et dans les modèles murins (37). La connaissance des divers rôles de STAU1 dans la cellule révèle donc une cible potentielle thérapeutique.

Bref, de par sa capacité à contrôler le destin des ARNm, STAU1 est un régulateur essentiel dans la cellule, autant pour le bon fonctionnement des cellules que dans certaines maladies et cancers. Des analyses à l'échelle du génome révèlent que les ARNm cibles de STAU1 codent pour des protéines ayant des fonctions hétérogènes, notamment impliquées dans la transcription, la traduction, la croissance cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (32).

L'interaction entre STAU1 et les ARNm

L'ARNm est lié par des facteurs agissant en trans comme, par exemple, STAU1 (38). STAU1 se lie aux ARNm qui possèdent un SBS, soit un domaine constitué d'une structure d'ARN double brin (33). La structure secondaire de l'ARNm est donc un déterminant clé pour sa régulation post-transcriptionnelle médiée par STAU1 (38). Il est connu que STAU1 lie les ARNm dans leur région non codante en 5' (5'UTR), 3'UTR et aussi dans leur CDS (33). Plus précisément, alors que les sites dans le 5'UTR et 3'UTR sont généralement constitués de longues séquences stables double brin, les sites d'interaction dans le CDS sont plutôt des structures secondaires complexes contenant de multiples hélices courtes double-brin (39). En outre, la structure double brin qui sert de SBS peut être constituée de différentes façons : des séquences répétées inversées intramoléculaires qui forment de longues tiges double brin (ARF1), des séquences Alu inversées intramoléculaires, des

séquences Alu en trans provenant de longs ARN non-codants ou d'autres transcrits ayant des séquences Alu et de régions riches en GC qui forment de courtes tiges double brin (19,39,40).

STAU1 lie les ARNm dans leur région 3'UTR

De nombreux transcrits possèdent des éléments Alu répétés inversés (IRAlu) dans leur région 3'UTR. Les éléments Alu sont une séquence intercalée et répétitive, et constituent les plus abondantes séquences dans le génome humain. Elles constituent plus que 10% du patrimoine génétique (41). Les IRAlu ont été primitivement considérés comme de l'ADN indésirable. Cependant, les éléments Alu sont souvent transcrits et peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression génique par divers mécanismes (42). Une fois que les IRAlu sont supprimés par la polyadénylation alternative, l'ARNm résultant est efficacement exporté vers le cytoplasme. Il a été découvert que la liaison de STAU1 aux séquences IRAlu en 3' UTR de ces ARNm empêche leur rétention nucléaire en compétitionnant avec la liaison de p54nrb dans le noyau, ce qui favorise l'exportation vers le cytoplasme (41). Une fois hors du noyau, STAU1 joue également un rôle dans la traduction de ces ARNm. Lorsque l'ARNm est lié par STAU1, il a été constaté que cette interaction favorise la traduction en empêchant la liaison de la protéine kinase R (PKR). Ceci prévient l'activation de PKR qui est responsable de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction 2α eucaryote (eIF2 α), résultant en une répression de la traduction cellulaire globale (41). Une surexpression de STAU1 augmente la production de la protéine EGFP dont l'ARNm contient l'IRAlus-NICN1 et IRAlus-LIN28. Cependant, la traduction de l'ARNm d'EGFP qui n'a pas l'IRAlus, n'est pas augmentée. En présence, de STAU1, les ARNm EGFP-IRAlus-NICN1 et EGFP-IRAlus-LIN28 ont été enrichis d'environ six fois et neuf fois respectivement comparés à l'ARNm d'EGFP. Cela suggère que STAU1 se lie principalement aux 3'UTR de chaque ARNm d'IRAlu. Ces résultats indiquent que STAU1 interagit avec IRAlus en 3'UTR des ARNm et augmente leur exportation et/ou leur traduction (41). En revanche, la liaison de STAU1 à une séquence Alu simple se situant en 3' UTR des ARNm mène à une SMD (43).

Les SBS peuvent être formées par un appariement imparfait des bases entre un élément Alu dans le 3'UTR d'une cible et un autre élément Alu formant une région double brin (43). En temps normal, les ARNm anormaux et naturels sont dégradés par la dégradation de l'ARNm non-sens ou nonsense-mediated mRNA decay (NMD), lorsqu'ils terminent la traduction suffisamment

en amont d'une jonction exon-exon générée par épissage (44). Cependant, STAU1 peut se lier directement à Upf1 et provoquer le SMD lorsque l'ARNm est attaché dans le 3'UTR, soit en aval d'un codon de terminaison (44). STAU1 est aussi connu pour son interaction avec l'ARNm du facteur ADP-ribosylation (Arf1) dans sa région 3' UTR, ce qui déclenche le SMD. Arf1 permet une modification post-traductionnelle réversible engagée dans de nombreux processus cellulaires, particulièrement la réparation de l'ADN, la signalisation cellulaire, l'apoptose ainsi que la régulation génique (45,46). Conséquemment, la régulation négative de STAU1 ou de Upf1 augmente la stabilité de l'ARNm d'Arf permettant plusieurs processus cellulaires (44). Une expérience réalisée par Sugimoto et son équipe, en utilisant l'isoforme STAU1⁵⁵, a aussi montré un abaissement de la quantité des ARNm causé par la SMD lorsque STAU1 se lie dans sa région 3'UTR, mais aucun changement dans l'efficacité de la traduction (33). En revanche, Ricci et ses collaborateurs, qui utilisaient l'isoforme STAU1⁶³, ont observé que la liaison de STAU1 dans l'extrémité 3' UTR des ARNm semble avoir peu ou pas de conséquence sur l'efficacité de leur traduction ou sur le niveau de leur transcrit à l'état d'équilibre. Il n'y a pas d'évidence de SMD des ARNm (39). Bref, la liaison de STAU1 en 3' UTR des ARNm pourrait réguler positivement, négativement ou ne pas avoir d'effet sur leur niveau d'expression des ARNm dans la cellule.

STAU1 lie les ARNm dans leur région 5'UTR

La surexpression de STAU1 a entraîné une augmentation de la traduction des ARNm dont le SDS se trouve à l'intérieur de leur 5'UTR dans les lysats de réticulocytes de lapin et dans les cellules de mammifères en culture. La présence de STAU1 n'a eu aucun effet sur la traduction des ARNm en absence de liaison à l'extrémité 5'UTR. Cela suggère que l'interaction de STAU1 avec des ARNm dans leur 5'UTR favorise leur traduction. Il est aussi connu que l'interaction de STAU1 avec le 5'UTR des ARN facilite l'initiation de leur traduction, puisque STAU1 lie les ribosomes simultanément (47). De plus, STAU1 interagit avec le 5'UTR de l'ARN du cible mécaniste de la rapamycine ou mechanistic target of rapamycin (mTOR) et augmente sa traduction. mTOR est un enzyme engagé dans la prolifération cellulaire, croissance cellulaire, motilité cellulaire, survie cellulaire et activités traductionnelles et transcriptionnelles. Notamment, l'activation de mTOR favorise la synthèse protéique et inhibe l'autophagie. Elle est aussi impliquée dans la réponse cellulaire au stress en inhibant l'initiation de la traduction et en augmentant le recyclage des

composants cellulaires par autophagie. Par cette interaction, STAU1 encourage la traduction de mTOR, ce qui fait de lui aussi un des médiateurs de la réponse cellulaire au stress (48). En somme, l'interaction de STAU1 avec le 5'UTR des ARNm permet l'augmentation de leur expression.

STAU1 lie les ARNm dans leur région CDS

Comme mentionné précédemment, STAU1 interagit non seulement avec les régions 3'UTR et 5'UTR des ARNm, mais aussi peut lier l'ARNm dans la région CDS (33). Lors de son association au CDS, STAU1 interagit simultanément avec les ribosomes et les ARNm proportionnellement à leur contenu en GC et à leur propension à former une structure secondaire interne (39). Plus la teneur en GC est élevée dans le CDS, plus l'association à STAU1 est favorisée, ce qui mène à une densité ribosomique plus grande. Cela renforce le rôle général de STAU1 dans la modulation de l'élongation de la traduction à travers des régions CDS structurées (39). Il est également observé que la liaison de STAU1⁶³ au CDS entraîne une occupation accrue des ribosomes ainsi qu'une diminution des niveaux d'ARNm; cela est proportionnel à la fois à la quantité de STAU1 liée et au contenu en GC de l'ARNm cible (39). Cependant, l'inverse a été aussi montré lorsque l'isoforme STAU1⁵⁵ est utilisé. Une étude a permis de constater qu'il y a une augmentation de la traduction en absence de STAU1 lorsque le SDS se localise dans la région CDS (33). Cela suggère que le SDS situé dans la région CDS peut entraîner un abaissement ou une augmentation de l'expression de l'ARNm.

STAU1 lie les ribosomes

Comme déjà mentionné, une grande partie des ARNm sont associés à STAU1 lors de leur traduction par des ribosomes (49). Une analyse par sédimentation sur des gradients de saccharose a montré que l'isoforme STAU1⁵⁵ co-fractionne avec les sous-unités ribosomales 40S et 60S. Ceci suggère que cet isoforme joue un rôle dans la traduction (49). L'association STAU1/ribosome est favorisée par un mécanisme dépendant de la liaison à l'ARN et d'une interaction protéine-protéine (49). Le dsRBD3 de STAU1 semble l'élément clé de cette interaction. Néanmoins, d'autres déterminants sont également nécessaires pour une association stable entre STAU1 et les ribosomes. Le fragment dsRBD4-TBD constitue le domaine minimal d'association protéine-protéine STAU1/ribosome (49). Suite à une séparation par centrifugation dans un

gradient de saccharose, une co-migration de STAU1 endogène avec les sous-unités ribosomales 40 et 60 S est observée (figure 4). Cela indique que STAU1 est associée aux ribosomes, ce qui aide la traduction des ARNm qu'elle lie (49).

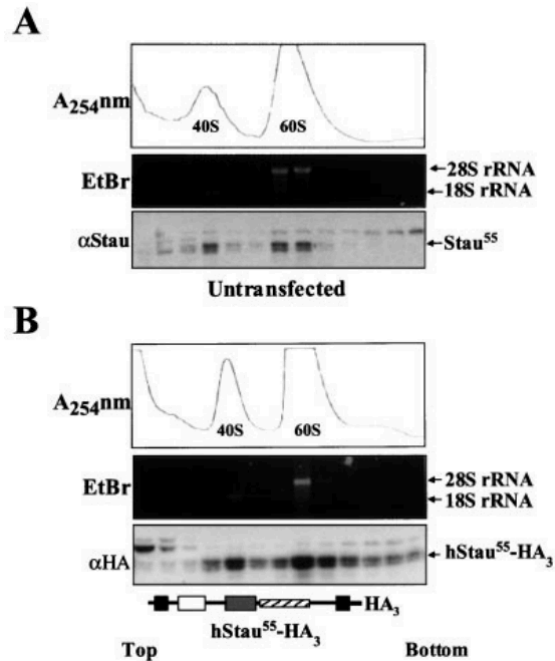


Figure 4. – Le co-fractionnement de STAU⁵⁵ endogène et des ribosomes

Des cellules COS7 non transfectées (**A**) ou des cellules transfectées avec un ADNc codant pour hStau⁵⁵-HA3 (**B**) ont été incubées en présence d'EDTA 25 mM et chargées sur un gradient linéaire de saccharose de 10 à 40%. Chaque fraction a été collectée et criblée afin de détecter l'ARN ribosomal par coloration au bromure d'éthidium du gel de formaldéhyde-agarose et pour Stau⁵⁵ par WB en utilisant des anticorps anti-STAU1 (**A**) ou anti-HA (**B**). Luo M, Duhaîne TF, DesGroseillers L. *Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association* (49).

En somme, l'interaction de STAU1 avec les ARNm permet de réguler l'expression de ceux-ci. Cette observation suggère que la modulation du niveau de STAU1 mène à une variation de l'expression post-transcriptionnelle des ARNm qu'elle lie. Ceci contribue donc au contrôle de la prolifération cellulaire, vu que STAU1 lie principalement des transcrits qui codent pour des protéines impliquées dans la transcription, la traduction, la croissance cellulaire et à la régulation du cycle cellulaire, notamment CDK4 et E2F1, des facteurs importants dans la transition G1/S (19,33,50).

STAU1 module le niveau des ARNm régulateurs du cycle cellulaire

Notre laboratoire a montré que la déplétion de STAU1 entraîne une diminution de la prolifération des cellules non cancéreuses en altérant les transitions G1/S et G2/M. Les résultats provenant d'analyses par cytométrie en flux (FACS) soulignent un plus haut pourcentage de cellules en phase G1 chez les cellules dont l'expression de STAU1 est inhibée par siARN (siS1) par rapport aux cellules contrôles (siNT) (figure 5-A). Il est également observé que les cellules siS1 n'entrent pas aussi efficacement en phase S que les cellules siNT, après relâche des cellules d'un arrêt en G0 (figure 6). Cela montre que les cellules ont du mal à passer la transition G1/S (32). La durée moyenne de la phase G1 est significativement plus longue pour les cellules déplétées de STAU1 que pour les cellules témoins (figure 5-B). Cela montre que la déplétion de STAU1 cause une accumulation de cellules en G1. Lorsque synchronisées puis relâchées de la phase G0, les cellules entrent de nouveau dans le cycle cellulaire et l'entrée des cellules en phase S est retardée pour les cellules déplétées de STAU1 comparées aux cellules contrôles. Un effet similaire a été observé à la transition G2/M. Par analyses cytométriques, le pourcentage de cellules synchronisées en G2/M baisse rapidement à mesure que les cellules transitent par la mitose pour entrer en G1. Chez les cellules traitées par le siARN contre STAU1, le pourcentage de cellules G2/M n'a pas diminué aussi efficacement. Cela indique que les cellules non tumorales déplétées en STAU1 sont bloquées à la fin de la phase G2 ou en phase M, ce qui pourrait moduler l'expression de plusieurs gènes importants dans la progression cellulaire par STAU1 (32).

Les travaux faits dans notre le laboratoire nous ont également permis d'identifier 35 gènes dont l'expression est modulée suite à la déplétion de STAU1 (figure 7). L'expression de 24 de ces gènes est significativement réduite, tandis que l'expression des 11 autres gènes est enrichie dans les cellules dont l'expression de STAU1 est inhibée, comparées aux cellules témoins. L'absence de STAU1 entraîne donc une dérégulation de 35 gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Ces gènes codent pour des protéines liées à des groupes d'ontologie tels que la transition de phase du cycle cellulaire G1/S et les points de contrôle du cycle cellulaire (32). Ces résultats suggèrent que des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle induits par STAU1 se produisent lors des transitions de phase du cycle cellulaire et que ces modulations sont nécessaires à la prolifération cellulaire (32). Parmi ces 35 gènes, nous avons remarqué une

diminution du transcrit de gène E2F1 chez les cellules non tumorales déplétées en STAU1 (32). E2F1 avec E2F2 et E2F3 forme une famille de facteurs de transcription dont l'activité est essentielle pour la progression de la phase G1 vers la phase S (33,51). Ceci suggère que STAU1 régule la prolifération en liant et en contrôlant le destin des ARNm qui permettent l'avancement du cycle cellulaire. Non seulement, STAU1 est indispensable dans la progression cellulaire, elle participe également à la différenciation cellulaire (32).

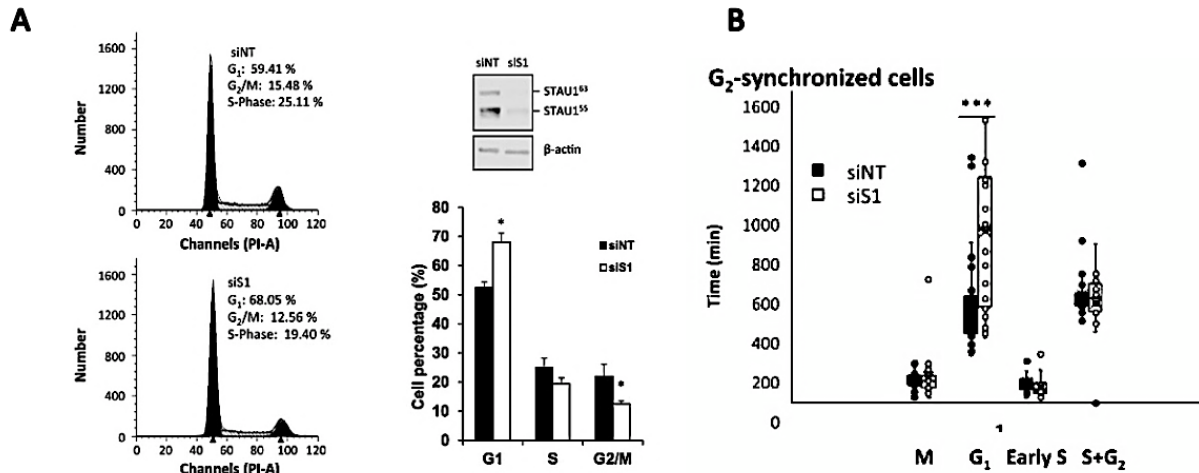


Figure 5. – Une accumulation de cellules en phase G1 en absence de STAU1

(A) 48 h après la transfection, les cellules ont été récoltées pour une analyse de leur distribution dans le cycle cellulaire par FACS et analyse WB. La quantification de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire est présentée dans trois expériences indépendantes. Student test t * valeur $p \leq 0,05$, ** valeur $p \leq 0,01$.

(B) La quantification de la longueur de chaque phase du cycle cellulaire des cellules déplétées en STAU1 et témoins synchronisées en phase G2 (32).

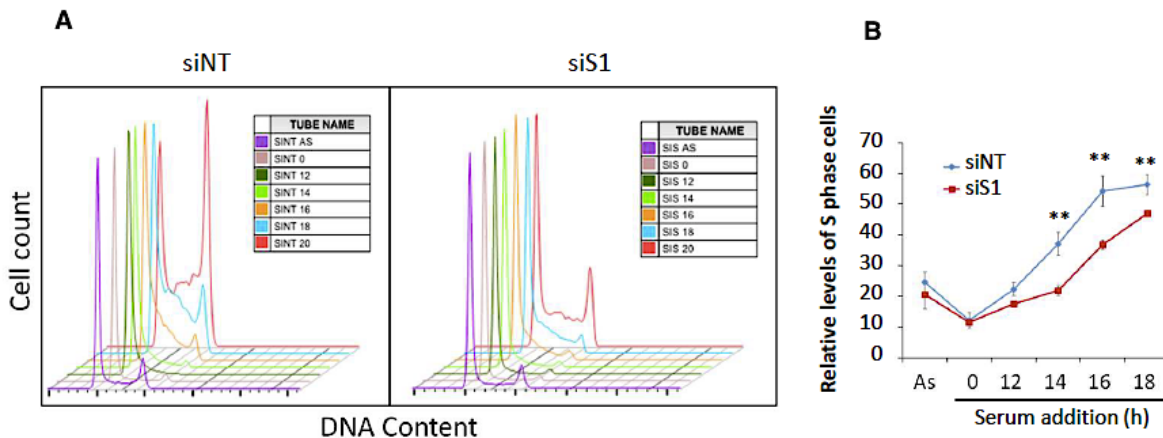


Figure 6. – La déplétion de STAU1 empêche l'entrée en phase S

(A) Les cellules hTERT-RPE1 (siNT et siS1) ont été privées de sérum durant 24. Les cellules ont ensuite été récoltées à différents temps après l'addition de sérum. Les cellules ont été analysées par FACS pour détecter le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (32).

(B) Le graphique représente la moyenne et l'écart type du pourcentage de cellules en phase S à un moment précis après la libération. Student test t ** valeur $p \leq 0,01$ (32).

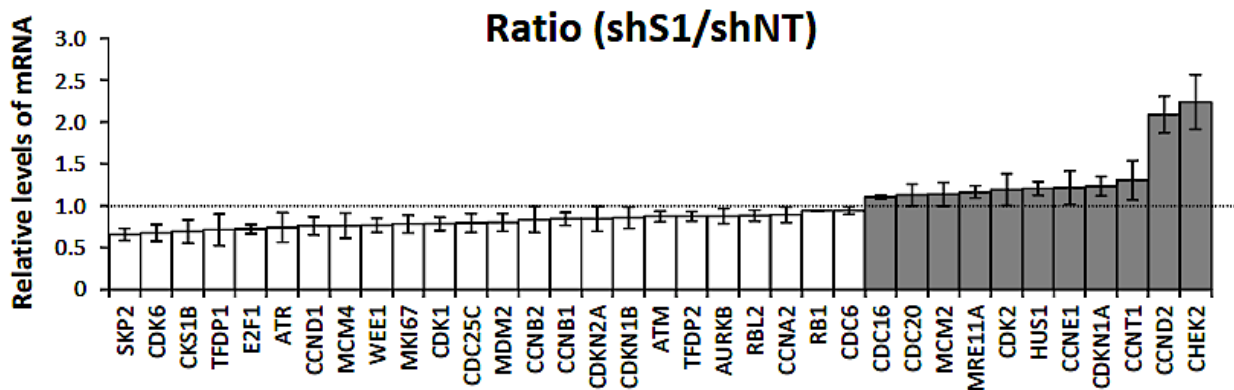


Figure 7. – La déplétion de STAU1 module l'expression génique des régulateurs du cycle cellulaire

Le niveau relatif d'ARNm de 35 gènes codant pour des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire montrant une différence significative entre les cellules déplétées en STAU1 par une infection des shARN dirigés contre STAU1 (shS1) et les cellules témoins par une infection des shARN dirigés contre une cible non spécifique (shNT) (32).

Les rôles de STAU1 dans le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire eucaryote est contrôlé par un réseau de protéines rigoureusement régulé. Il passe par des transitions étroitement contrôlées pour assurer que des événements spécifiques se déroulent de manière ordonnée (52). La fréquence élevée de mutations des protéines régulatrices des points de contrôle de l'ADN et des points de contrôle de la division cellulaire corrèle avec l'oncogenèse (53).

La transition G1/S

Une protéine régulatrice notable qui est souvent mutée dans le cancer est la protéine de rétinoblastome (pRB) suppresseur de tumeur. pRB est un inhibiteur de la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S. Plus précisément, pRB régule une vague transcriptionnelle qui s'initie pendant la phase G1 et s'inactive pendant la phase S (50). pRB inhibe les facteurs de

transcription E2F en les liant physiquement, ce qui empêche leur activité (54). Durant la phase G1, l'activité de la kinase dépendante de la cycline ou cyclin-dependent kinases (CDK) initie la transition de la phase G1 vers la phase S et donc favorise la réplication de l'ADN. L'activation de la CDK initie une boucle de rétroaction positive qui augmente encore l'activité de CDK, ce qui inhibe pRB et active les E2F. Cela engage la cellule à initier la phase S et la réplication de l'ADN en induisant des changements transcriptionnels à l'échelle du génome (50). La précision de la transition de la phase G1 du cycle cellulaire à la phase S est cruciale pour le contrôle de la prolifération des cellules eucaryotes. Une dérégulation de cette transition favorise l'oncogenèse (50). Les transcrits produits en G1/S codent pour des protéines régulatrices qui sont aussi impliquées dans les événements en aval dans la progression du cycle cellulaire. Une mauvaise régulation de la fonction des CDK et des E2F est fréquente dans le cancer, ce qui renforce le rôle de la transcription G1/S dans l'oncogenèse (55).

Les rôles de CDK4 dans la cellule

Les CDK sont des sérine/thréonine kinases. L'activité catalytique de ces CDK est modulée par les interactions avec les cyclines ainsi que par des inhibiteurs de CDK (CKI). Une coopération étroite entre les trois protéines est nécessaire pour assurer une progression ordonnée du cycle cellulaire. Les CDK, les cyclines et les CKI sont indispensables dans des processus tels que la transcription, la régulation épigénétique, le métabolisme, le renouvellement automatique des cellules souches, les fonctions neuronales et la spermatogenèse (56). Il a été montré que la surexpression des complexes CDK4/cycline D1 cause la suppression de la différenciation neuronale. La perte de CDK2 et de CDK4 peut induire le passage de la prolifération à la différenciation dans les cellules souches neurales ou neural stem cells (NSC) (57). CDK4 est aussi un régulateur essentiel pour les types de cellules spécifiques. En absence de la CDK4, les fibroblastes embryonnaires prolifèrent normalement, mais ont une phase S retardée (58). De plus, une ablation de CDK4 chez les souris entraîne une diminution de la croissance et l'infertilité (58). En revanche, les souris exprimant CDK4 mutant qui ne peut pas se lier à l'inhibiteur du cycle cellulaire développent une hyperplasie pancréatique due à une prolifération anormale de cellules des îlots-bêta (58). Le complexe cycline D-CDK4/6 cible pRB, ce qui diminue sa capacité à supprimer l'activité des ARN polymérase I/III et le facteur de transcription E2F donc la

transcription génique, ce qui joue un rôle majeur dans la limitation de la transition entre les phases G1 et S (59,60). Cela montre l'importance de CDK4 dans la progression de la phase G1 vers la phase S durant le cycle cellulaire, une transition irréversible (60). Son activité est contrôlée par les cyclines de type D (CD) et l'inhibiteur de CDK p16 (INK4a) à travers les sous-unités de régulation (61). Le suppresseur de tumeur p16INK4A inhibe spécifiquement l'assemblage et l'activation des complexes de cycline D-CDK4/6. Le contrôle supplémentaire de cette voie se fait via une boucle de rétroaction négative dans laquelle l'inactivation de pRB1 par CDK4/6 atténue la suppression de p16INK4A induite par pRB1, entraînant une augmentation de p16INK4A et une réduction subséquente de l'activité de CDK4/6 (59). Ces régulations font en sorte que l'activité de la kinase CDK4 est limitée à la phase G1-S (59). Des mutations de ce gène sont associées à la tumorigenèse de divers cancers. Par exemple, la voie CDK4 est dérégulée dans 90% des mélanomes, ce qui fait de CDK4 une cible thérapeutique évidente pour cette maladie (62). Sugimoto et ses collaborateurs ont montré par hiCLIP que STAU1 se lie à la CDS de l'ARNm de CDK4, dont les séquences sont; GGTGCCT (sens) et AGGCACC (antisens) (33). Comme STAU1 contrôle le destin de l'ARNm qu'elle lie, cela suggère que STAU1 pourrait également jouer un rôle important dans l'expression de CKD4 (19). Les résultats provenant de notre laboratoire montrent que le niveau de la protéine CDK4 augmente dans les cellules déplétées en STAU1 malgré des quantités similaires du transcrit CDK4. Cela dit, STAU1 semble réguler négativement la traduction de CDK4 en se liant à sa région CDS (63).

Les rôles d'E2F1 dans la cellule

E2F est une famille de facteurs de transcription. Cette famille de protéines joue un rôle crucial dans de nombreuses voies liées à la division cellulaire, à la réparation de l'ADN, à l'apoptose, à la prolifération et à la différenciation (64,65). La dérégulation des E2F est un marqueur de plusieurs cancers (66). Les E2F s'associent à pRB, son inhibiteur. Par leur liaison, les E2F sont aussi des déterminants nécessaires à la régulation de la différenciation puisque pRB interagit avec d'autres régulateurs de la transcription, tels que MyoD, C/EBPs et HBP1 qui influencent le développement cellulaire (54,67). La famille d'E2F est composée de 8 membres, certains sont des activateurs et d'autres des répresseurs de la transcription (64,68). Les E2F1, E2F2 et E2F3 sont les activateurs de la famille. L'expression de ces trois E2F est dépendante de la

croissance cellulaire. Ces activateurs de la transcription sont spécialement engagés dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (54). Ils sont essentiels pour la transition G1/S. La présence de E2F1, E2F2 et E2F3 est suffisante pour induire la phase S dans des cellules de culture tissulaire en privation de sérum (51,54). La perte des trois E2F activateurs entraîne un arrêt aigu du cycle cellulaire (68). Nous nous concentrerons davantage sur E2F1 qui est engagé dans la régulation de nombreux gènes importants pour la progression du cycle cellulaire (69). La surexpression de E2F1 augmente non seulement l'expression de la cycline E, mais aussi celle de la cycline D1 qui sont des cyclines permettant la transition G1/S (70). En plus, E2F1 est un régulateur clé de la réponse aux dommages de l'ADN et de l'apoptose (69). Une étude chez la drosophile montre que E2F1 dysfonctionnelle au cours de la phase S peut déclencher l'apoptose (71). E2F1 possède la capacité paradoxale d'induire l'apoptose en transactivant p19ARF dans la voie p53. Il peut également amorcer la mort cellulaire programmée indépendamment de p53 en transactivant des gènes proapoptotiques, tels que p73, Apaf-1 et les caspases (66). La surexpression de E2F1 ex vivo conduit à l'apoptose des cellules du cancer du sein. Plusieurs groupes utilisent des modèles de souris pour comprendre les processus régulés par E2F1 sur le développement du cancer. Ceci dit, E2F1 sensibilise les cellules à la radiothérapie et à la chimiothérapie (69). La conclusion de ces études est que E2F1 est la fois un oncogène et un gène suppresseur de tumeur. Des effets positifs et négatifs sur la tumorigenèse peuvent être observés si E2F1 est absent ou surexprimé (72). E2F1 est alors crucial pour le bon fonctionnement du cycle cellulaire. Par hiCLIP, il a été montré que STAU1 se lie à une région double-brin dans le 3'UTR du transcrit E2F1, dont les séquences sont les suivantes; GGGGTGGG (sens) et CCCACCCT (antisens) (33). Donc, la présence de STAU1 pourrait également participer à la transition G1/S et à la voie apoptotique induite par E2F1.

De plus, par une d'immunoprécipitation de la chromatine, des sites de liaison d'E2F1 sur le promoteur de STAU1 ont été observés (ENCODE consortium). Donc, pour étudier l'effet potentiel de E2F1 sur l'expression de STAU1, les auteurs ont surexprimé un plasmide codant pour E2F1 dont l'activité est sous le contrôle du récepteur des œstrogènes. En présence de tamoxifène, le niveau d'ARNm de STAU1 augmente indiquant que l'expression de STAU1 est positivement régulée par l'activité de E2F1 (figure 8) (32).

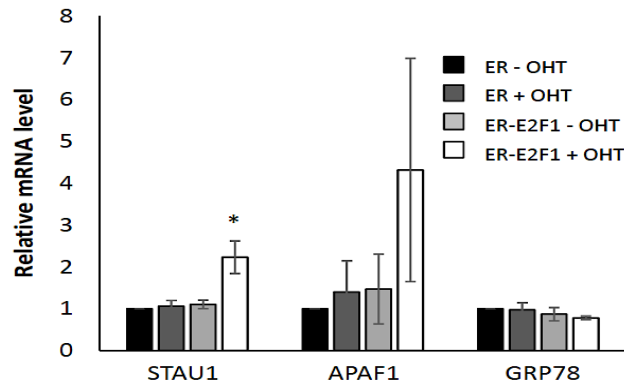


Figure 8. – La quantification de l'expression de STAU1 endogène par RT-qPCR.

L'expression de STAU1 est normalisée sur celle de GAPDH. L'expression en absence de OHT et E2F1 (ER-OHT) a été arbitrairement fixée à 1. Test t de Student * Valeur P ≤ 0,05 (32).

La transition de la mitose

Le point de contrôle de la transition de la phase G2 à la phase M sert à empêcher la cellule d'entrer en mitose avec des dommages à l'ADN génomique, offrant la possibilité de réparer et d'arrêter la prolifération des cellules endommagées (73). Le point de contrôle G2 permet de maintenir la stabilité génomique; il est un élément important dans la compréhension des causes moléculaires du cancer (73).

Des études antérieures indiquent que plusieurs des ARNm liés à STAU1 codent pour des protéines impliquées dans la transcription et le contrôle du cycle cellulaire (19). Des travaux récents de notre laboratoire ont montré que les premiers 88 de l'extrémité N-terminale de STAU1, constituant le dsRBD2, contribuent à la régulation négative de l'expression de STAU1 durant la mitose et que cette régulation à la baisse de STAU1 protège plusieurs transcrits de la dégradation (19).

Au cours du cycle cellulaire, le niveau de STAU1 oscille. Notre laboratoire a montré que l'expression de STAU1 diminue lors du transit de la mitose (19). Cette dégradation de STAU1 est médiée par le système ubiquitine-protéasome ou ubiquitin-proteasome system (UPS) et le E3 ubiquitine-ligase Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) (19). Le dsRBD2 permet la liaison à l'APC/C via son interaction avec les co-activateurs Cdh1 et Cdc20, promouvant ainsi la dégradation partielle de STAU1 (19). Nous avons aussi observé que le niveau d'expression de

STAU1 pendant les phases G2-M du cycle cellulaire influence l'entrée en mitose des cellules cancéreuses. Le mécanisme moléculaire qui régule l'entrée en mitose implique donc le domaine N-terminal de STAU1 (19). Par conséquent, la modulation des niveaux de STAU1 par les effecteurs du cycle cellulaire peut dicter l'expression post-transcriptionnelle de ses transcrits liés et peut contribuer au contrôle de la prolifération cellulaire (19). La fluctuation du niveau de STAU1 perturbe la transition G2/M. Sa surexpression dans les cellules tumorales altère l'entrée en mitose, entraînant ainsi une diminution de leur prolifération. Cette baisse de prolifération n'est pas induite par la mort cellulaire ou la sortie du cycle cellulaire. Cet effet anti-prolifératif dû à la surexpression de STAU1 est cependant perdu lorsque la protéine STAU1 tronquée de son dsRBD2 est surexprimée. Ainsi, les premiers 88 aa du côté N-terminal de STAU1, participent non seulement à la dégradation de la protéine, mais aussi à l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse (19).

Les rôles de STAU1 sur le FM

La localisation de STAU1 sur le FM

Des études récentes de notre laboratoire ont montré qu'une importante population de STAU1 est localisée au FM dans les cellules cancéreuses HCT116 ainsi que dans les cellules non cancéreuses hTERT-RPE1. La localisation de STAU1 sur le FM est illustrée à la figure 9. Pendant toutes les phases de la mitose, STAU1 a été observée aux pôles du fuseau et également sur les fibres, tandis que durant la télophase, une fraction de STAU1 est répartie dans le cytoplasme et l'autre fraction est présente sur les microtubules du fuseau polaire (23). Curieusement, STAU1⁶³ ne se retrouve pas dans les extraits des FM isolés, ce qui est inattendu puisque la séquence de STAU1⁵⁵ est entièrement incluse dans celle de STAU1⁶³ (23). Il est probable que les acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale de STAU1⁵⁵ pour générer STAU1⁶³ modifient la structure du déterminant moléculaire impliqué dans l'association de STAU1⁵⁵ avec le fuseau et le rendent inaccessible à l'interaction protéique. Nous observons aussi que STAU1 contribue au processus de localisation des ARNm sur le FM (23).

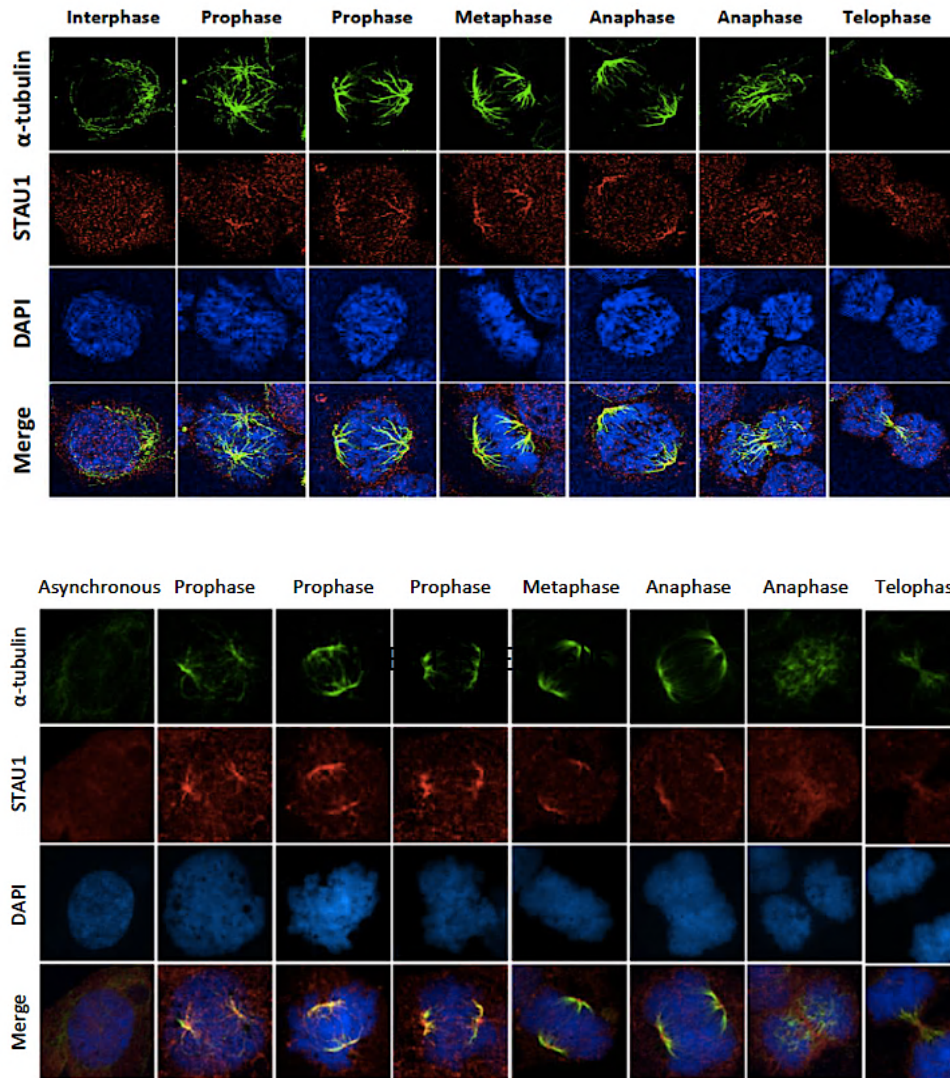


Figure 9. – La localisation de STAU1 sur le FM

Les cellules HCT116 (en haut) et les hTERT-RPE1 (en bas) ont été synchronisées à la fin de la phase G2 avec l'inhibiteur de CDK1 RO-3306, et relâchées pour atteindre la mitose. Les microtubules du fuseau mitotique ont été stabilisés avec du Taxol. Puis les cellules ont été observées par microscopie confocale avec les anticorps contre STAU1 (rouge) et α -tubuline (verte). L'ADN a été coloré avec DAPI (bleu) (23).

STAU1 participe à la maturation des ARNm sur le FM chez les cellules tumorales

Par des expériences de séquençage d'ARN à large échelle, un enrichissement d'ARN aux FM isolés a été observé par rapport à celui dans l'extrait cellulaire total ou input (IN) (figure 10-A) (23). Près de la moitié de ces transcrits proviennent d'ARN codant pour des protéines. Il a été

aussi remarqué que le niveau d'ARN codant pour des protéines est plus élevé aux FM des cellules délétées en STAU1 ou STAU1 knock out (KO) que dans les cellules sauvages ou wild type (WT). Le destin de ces transcrits n'est pas clair. Cependant, il est connu que les protéines essentielles nécessaires à la mitose sont synthétisées avant la prophase et que la traduction mitotique et l'inhibition de cette traduction sont importantes pour une bonne progression mitotique (75,76). Ces ARNm sont des cibles connues de STAU1, suggérant que STAU1 peut être un facteur critique dans un mécanisme d'inhibition de la traduction pendant la mitose (23). De plus, l'expression globale dans l'IN ne change pas dans les cellules KO par rapport aux cellules WT. Mais, une délocalisation des ARN sur les FM a été identifiée chez les cellules KO (23). Il est donc probable que STAU1⁵⁵ soit responsable du transport et/ou de la localisation d'ARN spécifiques au FM ainsi que de leur régulation post-transcriptionnelle sur le FM.

La délétion de STAU1 provoque le déplacement de plusieurs transcrits, y compris celui d'ARN précurseur ribosomique (pré-ARNr) et des 154 ARNm codants pour les protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine et la croissance cellulaire. Ceci met en évidence le rôle de STAU1 dans le trafic d'ARNm vers le FM. La quantité de chaque ARN au FM est normalisée à celle dans l'IN (ARN-FM / ARN-total) et ensuite les ratios sont comparés dans les cellules KO vs WT. 771 ARN ont été identifiés, y compris l'ARN28S5, les miARN (mir3648 et mir3687) et 154 ARNm codant pour des protéines dont la quantité au fuseau est au moins deux fois plus faible dans les cellules KO que dans les cellules WT (figure 11) (23). La comparaison de la quantité d'ARN au FM des cellules WT et KO montre que STAU1 cause une délocalisation de plusieurs ARNm. Ces données affirment que STAU1 contrôle la localisation de sous-populations d'ARN pendant la mitose, et suggère un nouveau rôle de STAU1 dans la maintenance des pré-ARN ribosomiques durant la mitose, la ribogenèse et/ou le réassemblage des nucléoles (23).

Il est aussi remarqué que STAU1 associée au FM est co-localisée en partie avec les ribosomes et les sites actifs de traduction (23). La présence de ribosomes et de sites actifs de traduction suggère que la traduction peut se produire sur le FM corrélant avec la présence de plusieurs ARNm associés au FM. En plus, ces ARNm se trouvent dans les listes de protéines qui sont traduites pendant la mitose (77). La traduction mitotique contribue en effet à réguler le niveau des protéines nécessaires pour l'entrée mitotique (78). Conséquemment, la délétion de

plusieurs de ces ARNm enrichis au FM par interférence à l'ARN altère l'organisation normale des pôles du fuseau et la distribution de la γ -tubuline indiquant que la traduction locale de ces ARNm sur le FM est primordiale pour la progression de la mitose (79).

L'analyse transcriptomique des extraits des FM purifiés relève que 1054 ARN constitués d'ARNm, de pré-ARNr, d'ARN longs non codants (ARNlnc) et de petits ARN nucléolaires (ARNsno) impliqués dans l'assemblage et le traitement des ribonucléoprotéines sont enrichis au FM par rapport à l'IN (figure 10-B) (23). Un des ARN les plus abondants des FM isolés est celui de l'ARN28S5 (pré-ARNr 45S) (23). Pendant la télophase et le début G1, le pré-ARNr 45S hérité de la mitose de la cellule mère est requis pour réguler la distribution des composants au réassemblage des nucléoles des cellules filles (80). Notre étude indique maintenant que les pré-ARNr, ainsi que de nombreux snoARN impliqués dans la maturation des ARNr, sont associés au FM lors de la mitose permettant leur ségrégation dans les deux cellules filles et le réassemblage des nucléoles (23).

En utilisant une valeur FPKM (fragments par kilobase de transcription par million de lectures mappées) de 1 comme seuil pour l'expression des gènes, seulement 108 ARN sont modulés dans les cellules KO par rapport aux cellules WT. 35 ARNm codants pour les protéines et quatre pour ARNnc sont régulés à la hausse tandis que 68 ARNm codants pour les protéines et un ARNlc sont régulés à la baisse dans les cellules KO (23). Il a été proposé que certains transcrits sont traduits sur les fuseaux alors que d'autres sont des cargos inactifs en traduction qui sont ensuite séparés dans les cellules filles (78). Ceci montre que STAU1 module le niveau de plusieurs ARNm au FM.

Les ARN enrichis au FM en présence de STAU1 ont tous des fonctions importantes dans la cellule. Il a été montré que la surexpression de l'ARN28S5 module le rapport d'ARNr 28S/18S et diminue les niveaux d'ARNm de protéines ribosomales, il sert donc de régulateur clé dans l'expression des protéines ribosomales (81). Les miR-3648 sont induits sous le stress du réticulum endoplasmique (ER) dans les cellules humaines. Ils ciblent la polyose adénomateuse coli 2 ou Adenomatous polyposis coli 2 (APC2) qui est un suppresseur de tumeur et un régulateur négatif de la signalisation Wnt (82). L'inhibition du miR-3648 augmente les niveaux d'APC2, ce qui

diminue la prolifération cellulaire. L'inverse est aussi vrai. Lorsque le miR-3648 est surexprimé, les niveaux d'APC2 diminuent résultant en une augmentation de la croissance cellulaire. Ceci démontre que les miR-3648 régulent le niveau du APC2 dans les cellules humaines, qui a ensuite régulé à la baisse APC2 pour augmenter la prolifération cellulaire (82). Le miR-3687 a été identifié comme étant fortement exprimé dans le carcinome épidermoïde basoïde de l'œsophage. Un abaissement du niveau de miR-3687 entraîne un mauvais pronostic, alors que la régulation positive du miR-3687 favorise la migration et l'invasion cellulaire. Ces résultats montrent que miR-3687 a un impact négatif sur le pronostic des patients atteints du carcinome épidermoïde de l'œsophage (83). Ceci montre que STAU1 régule le niveau de plusieurs ARN important à la cellule. Bref, STAU1 est responsable de la modulation du niveau de plusieurs ARNm sur le FM (23).

En somme, le niveau de STAU1 au FM et sa régulation du destin ARNm sur les microtubules mitotiques sont donc importants dans la mitose, donc la prolifération cellulaire tumorale (23).

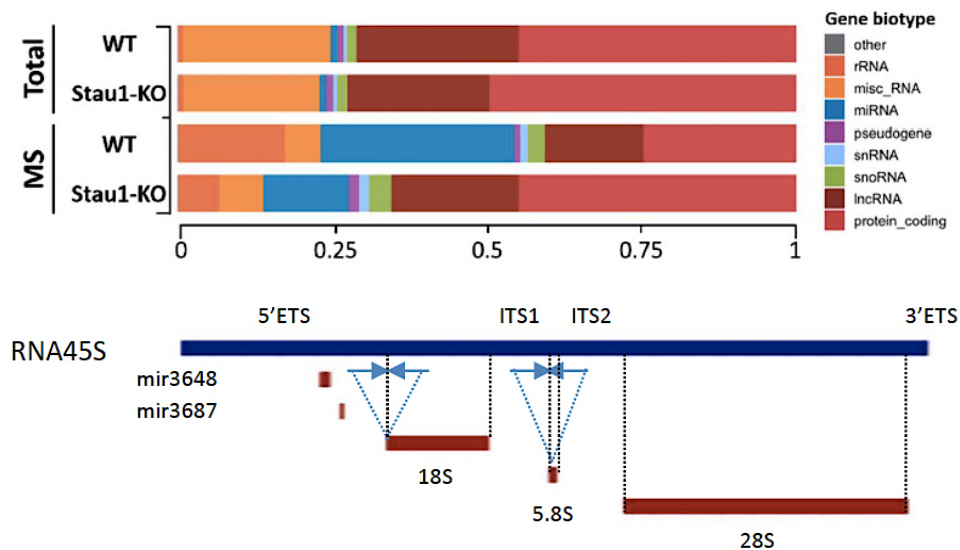


Figure 10. – Les transcrits enrichis sur les FM dans les cellules HCT116

(A) Un histogramme en transcrits par million (TPM) du contenu en ARN des extraits totaux de cellules mitotiques (Total) et aux FM (MS) des cellules HCT116 WT et KO. Les biotypes représentant moins de 1% de l'ensemble des MTP ont été regroupés sous «autres» (23).

(B) Un schéma du locus RNA28S5 montrant le pré-ARNr 45S. Les flèches indiquent la position des oligonucléotides utilisés pour RT-qPCR. La position des miARN et des ARNr matures est indiquée (23).

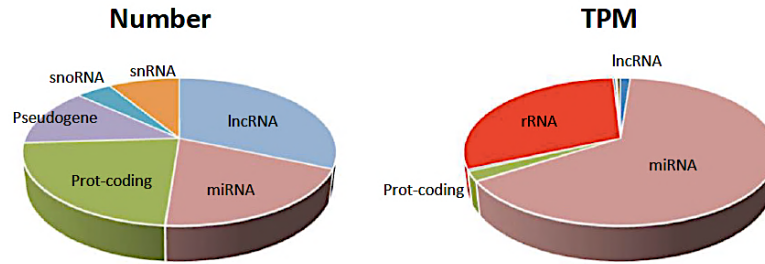


Figure 11. – La Localisation d'ARN médiée par STAU1 sur le fuseau mitotique

La quantité relative d'ARN délocalisés au FM chez les cellules HCT116 STAU1-KO. Le pourcentage du nombre de chaque type d'ARN (à gauche) et le pourcentage de TPM dans chaque type d'ARN (à droite) sont indiqués (23).

PROBLÉMATIQUES ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Problématique

STAU1 est une RBP jouant un rôle important dans le contrôle post-transcriptionnel de nombreux ARNm. Ainsi, elle est un régulateur clé qui participe à la régulation génique fine dans les cellules humaines (19). Notre laboratoire a montré que sa déplétion altère la prolifération des cellules non tumorales par un blocage de la transition G1/S et G2/M. En revanche, cela n'a aucune conséquence sur la prolifération des cellules cancéreuses (32). Étonnamment, ce phénomène est inversé lors de la surexpression de STAU1. Lorsque STAU1 est surexprimée, elle interrompt l'entrée en mitose causant une diminution de la prolifération tumorale (19,32), mais n'a aucun impact sur les cellules non cancéreuses. De ce fait, STAU1 est une cible thérapeutique spécifique potentielle dans le traitement du cancer.

Des études récentes ont montré que le niveau de 35 transcrits est perturbé suite à la déplétion de STAU1 dans les cellules non cancéreuses (32). Parmi ceux-ci, les ARNm CDK4 et E2F1 sont des cibles potentielles de liaison à STAU1, reconnues précédemment par des analyses d'immunoprécipitation suivies de séquençage de l'ARN à large échelle (33). Ces transcrits codent pour des protéines impliquées dans la transcription et le contrôle du cycle cellulaire (32). CDK4 est une cycline qui régule l'activité du pRB influençant ainsi l'activation d'E2F1 (59,60). E2F1 est un facteur de transcription clé impliqué dans la régulation de nombreux gènes importants pour la progression du cycle cellulaire (54). L'activité d'E2F1 est impliquée dans la régulation de la transition irréversible de la phase G1 vers la phase S. CDK4 et E2F1 sont donc des régulateurs essentiels du taux de croissance et de la prolifération cellulaire (59,60). Il est probable que STAU1 lie directement l'ARNm de ces protéines régulatrices par son SBS. Au vu de ces données, STAU1 régule-t-il la progression du cycle cellulaire en interagissant directement avec des ARNm impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire des cellules non tumorales et contrôle-t-il leur expression?

La surexpression de STAU1 altère l'entrée en mitose et cause une diminution de la prolifération tumorale (19,32). La localisation de STAU1 au FM joue sûrement un rôle clé dans le

destin des sous-populations d'ARN pendant la mitose et dans le transit harmonieux de la mitose et/ou sur l'avenir des cellules filles (23). Connaître les déterminants permettant la liaison de STAU1 au FM et les mécanismes qui régulent cette association pourra nous apprendre à mieux contrôler le cycle cellulaire.

Bref, l'effet de STAU1 diffère dans les cellules tumorales et les cellules non tumorales. La compréhension des différents rôles de STAU1 dans ces lignées cellulaires pourrait permettre de développer une approche pour combattre la prolifération des cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines.

Hypothèses

Comme mentionné antérieurement, nous avons remarqué une diminution de l'ARNm E2F1 lorsque STAU1 est déplétée dans les cellules non cancéreuse. De même, nous avons montré que, même si le niveau d'ARNm reste stable, l'expression de la protéine CDK4 est augmentée lorsque le niveau d'expression de STAU1 est diminué. Notre hypothèse est que STAU1 par la liaison aux transcrits via le SBS module l'expression de CDK4 et d'E2F1. Par conséquent, la destruction du SBS devrait abolir la régulation médiée par STAU1 sur ces ARNm puisqu'il y aura une perte d'interaction avec STAU1.

La localisation de STAU1 au FM joue un rôle important pour la transition mitotique. Nous voulons donc identifier le déterminant qui permet la localisation. Nous proposons, basé sur les travaux chez la drosophile, que les résidus importants pour la localisation de STAU1 sur les FM se trouvent à l'extrémité N-terminale de STAU1, dans la région de la boucle riche en proline et en acides aminés aromatiques (aa 27-43) (25,74).

Objectifs

Nos objectifs sont donc doubles : d'abord, ce projet vise à comprendre la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm CDK4 et E2F1 et de déterminer si la liaison de STAU1 au SBS de ces transcrits module l'efficacité de leur expression, un mécanisme connu de régulation par STAU1. Ce projet vise également à identifier le site spécifique qui permet l'interaction entre STAU1 et le FM.

RÉSULTATS

Les résultats présentés ci-dessous sont décrits dans :

- Mehdi Ghram, Florence Bonnet-Magnaval, Diana Ioana Hotea, Bellastrid Doran, Stevenson Ly, Luc DesGroseillers. Staufen1 is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation Via the Control of E2F1 Expression. *Journal of Molecular Biology*. 2020 Jun;432(13):3881–97.
- Sami Hassine, Florence Bonnet-Magnaval, Louis Philip Benoit Bouvrette, Bellastrid Doran, Mehdi Ghram, Mathieu Bouthillette, Eric Lecuyer, Luc DesGroseillers. Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle. *J Cell Sci*. 2020 Jun 23;jcs.247155.
 - L'article a été sélectionné pour être inclus dans la section «Research Highlights» du *Journal of Cell Science*
- Les résultats présentés dans ce mémoire reflètent ma contribution dans ces articles.

L'implication de STAU1 dans la transition G1/S du cycle cellulaire

STAU1 régule l'expression des protéines essentielles à la transition G1/S

Pour étudier la régulation médiée par STAU1 sur l'expression de CDK4 et d'E2F1, les cellules hTert-RPE1 sont infectées avec les plasmides rétroviraux exprimant des shARN contre une cible non spécifique (shNT) ou shARN contre STAU1 (shS1). Ces plasmides renferment également le gène de résistance à la puromycine. Une fois la sélection à la puromycine terminée, le niveau des protéines endogènes de ces cellules est détecté par WB.

Dans la figure 12-A, il est possible de noter que l'expression de CDK4 augmente significativement dans les cellules shS1 comparée à celle dans les cellules shNT. Cela montre que STAU1 régule négativement l'expression de CDK4. Contrairement à CDK4, nous observons que le niveau d'E2F1 diminue grandement chez les cellules shS1 par rapport à celui dans les cellules shNT, ce qui signifie que STAU1 module positivement l'expression d'E2F1 (figure 12-B). Ces résultats indiquent que STAU1 régule l'expression de plusieurs protéines essentielles à la transition G1/S.

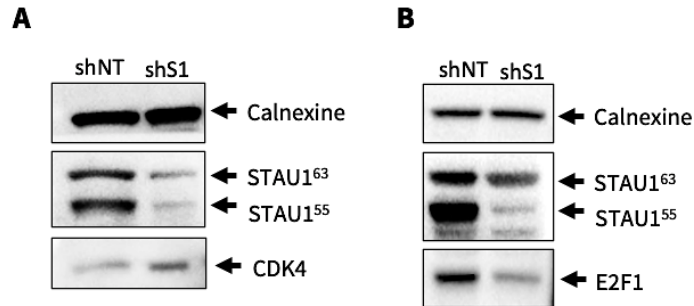


Figure 12. – La Localisation d'ARN médiée par STAU1 sur le fuseau mitotique

Les protéines endogènes sont détectées par WB avec des anticorps dirigés contre STAU1, **(A)** CDK4, **(B)** E2F1 et Calnexine (contrôle de dosage) chez les cellules hTert-RPE1 témoins (shNT) ou déplétées de STAU1 (shS1).

Nous avons observé que STAU1 module d'expression de CDK4 et d'E2F1. Maintenant, nous voulons étudier la stabilité de l'ARNm de ces protéines en présence et en absence de STAU1. Le contrôle de la dégradation/stabilité des ARN est en effet un mécanisme connu de régulation par STAU1 (32). Pour cela, le niveau de l'ARNm CDK4 et E2F1 est quantifié au moyen du kit PCR array de SA-Biosciences chez les cellules hTert-RPE1 shNT ou shS1.

Comme résultats, nous remarquons que le niveau relatif de l'ARNm CDK4 est stable autant chez les cellules shNT que les cellules shS1. En revanche, la quantité de l'ARNm E2F1 diminue significativement dans les cellules shS1 comparée à celle chez les cellules shNT (figure 13). Cela montre que STAU1 ne module pas le niveau de l'ARNm CDK4 et donc qu'elle régule probablement l'expression de CDK4 au niveau de la traduction. Par contre, la déplétion de STAU1 régule à la baisse le transcrit E2F1. Cela indique que STAU1 contrôle possiblement la stabilité de l'ARNm E2F1.

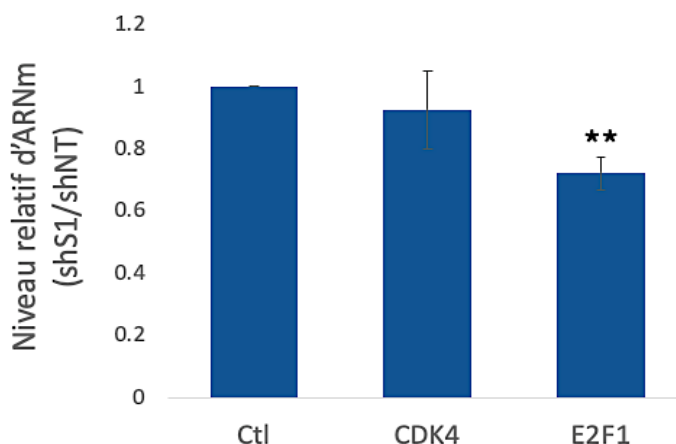


Figure 13. – La régulation de STAU1 sur l'ARNm CDK4 et E2F1

Le niveau d'ARNm codant pour CDK4 et E2F1 a été analysé dans les cellules hTERT-RPE1 shNT et shS1 à l'aide du kit PCR array (PAHS-020) de SA-Biosciences. Le graphique représente la moyenne de quatre expériences réalisées indépendamment. Les résultats obtenus chez les hTERT-RPE1 shS1 sont divisés par ceux obtenus chez les cellules hTERT-RPE1 shNT. Le contrôle théorique (Ctl) était arbitrairement fixé à 1. Test t de Student (**) $p \leq 0,01$.

La régulation de CDK4 par STAU1

Il est connu que STAU1 interagit avec un SBS dans la CDS de l'ARNm CDK4 (33). Pour étudier la régulation que STAU1 exerce sur l'expression de CDK4, un plasmide renfermant la région CDS endogène et un plasmide dont le SBS a été muté afin d'empêcher l'interaction avec STAU1, sont transfectés séparément dans les cellules hTert-RPE1 shNT et shS1 conjointement avec un plasmide codant pour la protéine verte fluorescente ou green fluorescent protein (GFP) comme contrôle interne de transfection. Les mutations apportées dans la moitié gauche de la séquence répétée inversée formant le SBS ne modifient pas la composition en aa de la protéine CDK4 (figure 14-C) (33). Ensuite, les protéines d'intérêt sont détectées par WB (figure 14-B).

Nous observons que la protéine GFP est bien exprimée. Cependant, même après plusieurs tentatives, les plasmides codants pour CDK4 et CDK4-MutL ne s'expriment pas. Les cellules sont en bonne forme et le protocole de transfection est valide vu que la protéine GFP en co-transfection est détectée. Il semble que les plasmides ne soient pas conformes pour exprimer les protéines dans cette expérience. Donc, nous nous sommes concentrés davantage sur la régulation d'E2F1.

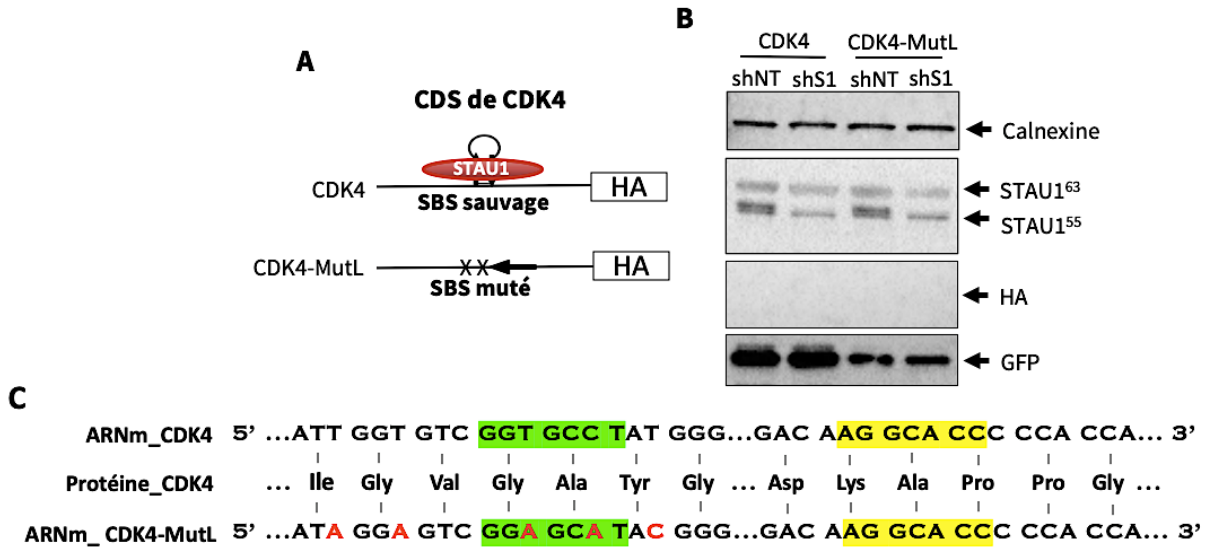


Figure 14. – STAU1 module l'expression de CDK4

(A) Schémas des constructions utilisés dans l'expérience. CDK4 : contient la CDS de CDK4 qui contient le SBS endogène. CDK4-MutL : contient le CDS de CDK4, dont la séquence de gauche du SBS est muté. X, mutations qui détruisent le SBS. Ces deux plasmides contiennent une étiquette HA.

(B) Les plasmides exprimant CDK4 et le CDK4-MutL sont transfectés indépendamment dans les hTert-RPE1 shNT et shS1 conjointement avec un plasmide codant pour la GFP. 24h post-transfection, les protéines dans les lysats cellulaires sont détectées par WB avec des anticorps dirigés contre STAU1, HA, Calnexine (contrôle de dosage) et GFP (contrôle de transfection).

(C) La CDS de l'ARNm CDK4 et sa séquence en aa. La section gauche du SBS est surlignée en vert. La moitié de droite du SBS est surlignée en jaune. Les nucléotides mutés sont en rouge.

La régulation d'E2F1 par STAU1

Il a été montré que STAU1 interagit avec deux séquences répétées inversées qui forme probablement une région double-brin dans le 3'UTR du transcrit E2F1 (33). Pour déterminer la régulation que STAU1 exerce sur l'expression d'E2F1, le plasmide contenant les gènes Firefly luciférase (Fluc) et Renilla luciférase (Rluc) a été utilisé pour fusionner le 3'UTR de l'ARNm E2F1 en aval du gène Rluc (FRluc-E2F1) (figure 15-A). Ce plasmide ainsi que le plasmide contrôle qui ne porte pas le 3'UTR d'E2F1 (FRluc) sont séparément transfectés dans les cellules non cancéreuses hTert-RPE1 et cancéreuses HCT116 sauvage (shNT ou WT) et dans les cellules hTert-RPE1 déplétées de STAU1 par expression de shS1 (shS1) ou dans les cellules HCT116 invalidées du gène

STAU1 (KO). 24h après la transfection, l'expression de Fluc et de Rluc est détectée par un essai luciférase. Après normalisation de l'expression Rluc sur l'expression de Fluc, le ratio (Rluc/Fluc) chez les cellules shS1 ou KO est divisée par celui chez les cellules shNT ou WT, respectivement. Le ratio (shS1/shNT) ou (KO/WT) nous permet d'observer la régulation médiée par STAU1 lorsque le 3'UTR de E2F1 est présent.

Dans la figure 15-B, nous observons que chez les cellules hTert-RPE1, le ratio (shS1/shNT) de FRLuc-E2F1 est environ deux fois plus faible que celui de FRLuc. Ceci est compatible avec la baisse d'expression d'E2F1 endogène chez les cellules déplétées en STAU1 en comparaison aux cellules témoins (figure 12-B). Pareillement pour les cellules HCT116, nous observons une diminution du ratio (KO/WT) de FRLuc-E2F1 comparé à celui de FRLuc. Cela montre que STAU1 régule positivement l'expression de la protéine E2F1 en interagissant avec le 3'UTR de l'ARNm E2F1 autant chez les cellules non tumorales que chez les cellules tumorales.

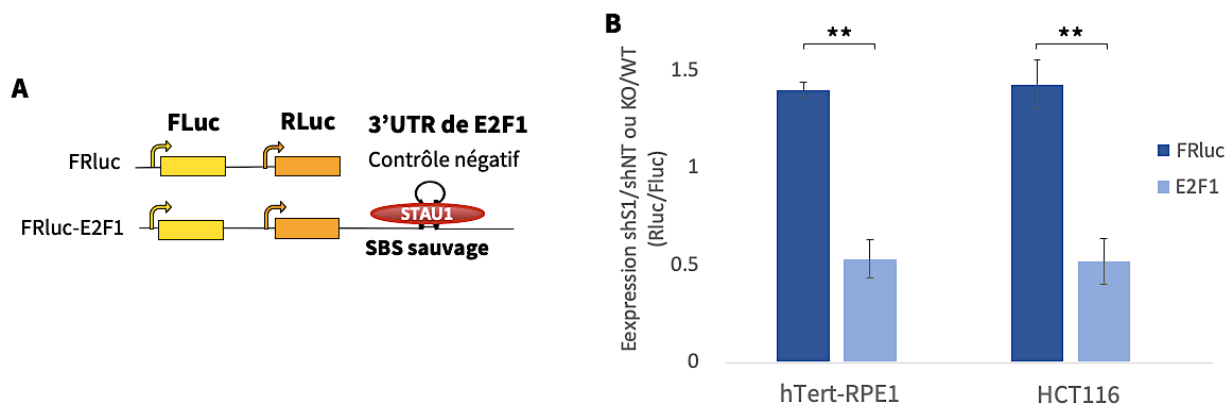


Figure 15. – Le 3'UTR d'E2F1 contient des éléments de régulation dépendants de STAU1

(A) Schémas des constructions utilisés dans l'expérience. FRLuc : contient les gènes Fluc et Rluc sous l'influence de promoteurs indépendants. FRLuc-E2F1 : contient le gène Fluc et le gène Rluc fusionné au 3'UTR d'E2F1. Le 3'UTR renferme le SBS.

(B) L'expression de Rluc seul (FRLuc) ou de Rluc sous l'influence du 3'UTR d'E2F1 (FRLuc-E2F1) dans les cellules non-tumorales hTert-RPE1 (shNT et shS1) ainsi que dans les cellules tumorales HCT116 (WT et OK) est détectée et quantifiée par un essai luciférase, puis normalisée sur l'expression de Fluc. Le ratio (shS1/shNT) ou (KO/WT) pour les deux lignées cellulaires est ensuite calculé. Il permet d'observer la régulation médiée par STAU1 lorsque le 3'UTR d'E2F1 est présent. Le diagramme représente la moyenne des 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques du test t de Student sont indiquées. (**) $P \leq 0,01$.

Afin de confirmer le rôle de STAU1 dans l'expression d'E2F1, nous avons créé un plasmide dont le SBS est muté de façon à empêcher la liaison à STAU1 (FRLuc-MutR). Les mutations sont portées sur le brin droit du SBS (figure 16-C). Les mutations ont pour but de détruire le SBS situé dans le 3'UTR de l'ARNm E2F1 afin d'empêcher sa liaison avec STAU1.

Dans la figure 16-B, nous constatons que le ratio (sh1/shNT) du FRLuc-MutR est d'environ deux fois plus élevé que celui de FRLuc-E2F1, alors que le ratio de FRLuc-E2F1 est plutôt semblable à celui du FRLuc. Cette augmentation d'expression du FRLuc-MuTR à un niveau comparable à celui du contrôle négatif montre que l'interruption d'interaction entre STAU1 et son SBS dans le 3'UTR de l'ARNm E2F1 mène à une perte de régulation d'expression de la protéine E2F1. Ce résultat confirme l'implication de STAU1 dans la régulation post-transcriptionnelle d'E2F1 via son association au SBS dans le 3'UTR chez les cellules non tumorales.

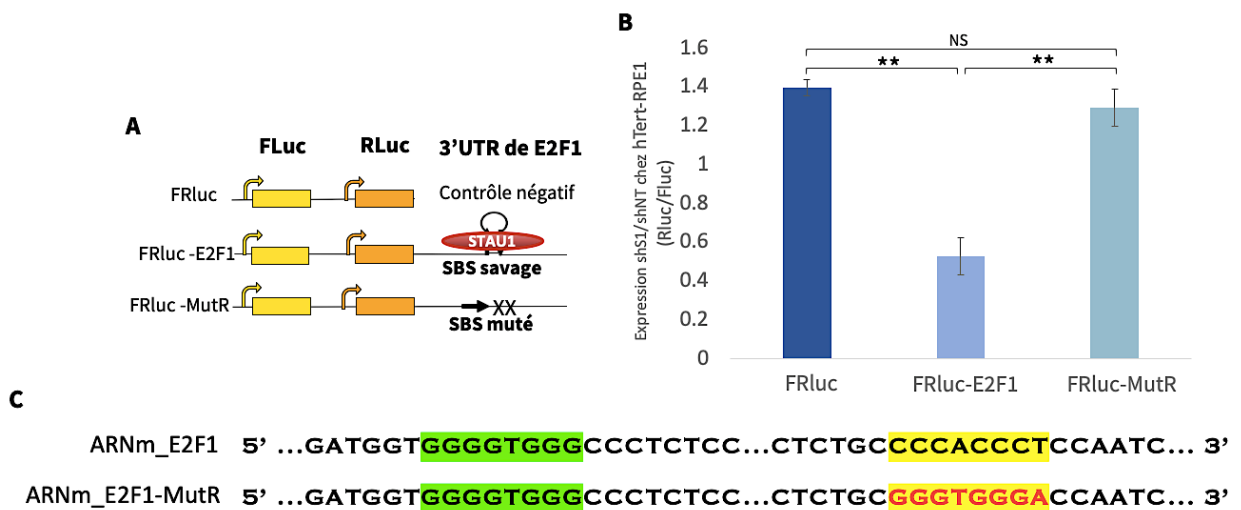


Figure 16. – STAU1 module l'expression d'E2F1 par sa liaison au SBS dans le 3'UTR

(A) Schémas des constructions utilisés dans l'expérience. FRLuc-MutR : contient le gène Fluc et le gène Rluc fusionné au 3'UTR d'E2F1, dont le SBS est muté. X, mutations qui détruisent le SBS. Veuillez consulter la légende de la figure 15-A pour plus de référence.

(B) Veuillez référer à la légende de la figure 15-B pour plus de précision. Test t de Student (**) $P \leq 0,01$. (NS) Non significatif.

(C) Le 3'UTR de l'ARNm E2F1. Le brin gauche du SBS est surligné en vert. Le brin droit du SBS est surligné en jaune. Les nucléotides mutés sont en rouge.

Les déterminants responsables de l'association de STAU1 au FM

La surpression de STAU1 altère la prolifération tumorale en bloquant l'entrée en mitose (19). Il est connu que STAU1 est localisée au FM lors de la mitose (23). Elle est responsable du transport et de la traduction des ARN sur le FM, ce qui est essentiel dans le point de contrôle mitotique et dans le développement des cellules filles (23). Il serait donc intéressant d'étudier les déterminants responsables de l'association de STAU1 au FM.

Alors, nous voulons déterminer le niveau de STAU1 et de ses mutants au FM dans les cellules cancéreuses. Pour y arriver, les plasmides contenant le gène de STAU1 sauvage et ses mutants sont transfectés indépendamment dans les cellules STAU1-KO HCT116 CRISPR 1.3 créées dans notre laboratoire (23). Ces cellules sont ensuite synchronisées en mitose avec du paclitaxel. Les FM de ces cellules transfectées sont isolés. L'isolation du FM est réalisée selon le protocole de Silljé and Nigg (2006) (84). Les protéines associées au FM et les protéines dans l'IN sont détectées par BW. Puis, la présence des protéines est quantifiée par le logiciel ImageJ ou ImageLab selon le mode d'exposition. Une fois que la quantification est faite, le ratio entre la quantité de STAU1 liée au FM et celui dans la cellule totale (FM/IN) est calculé. Puis, le ratio de chaque mutant est comparé à celui de STAU1.

Comme contrôle de la purification du FM, plusieurs protéines sont observées. Aurora A confirme que le fuseau purifié provient bien des cellules en mitose puisque cette protéine est un des régulateurs importants de la mitose en phase M (85). La calnexine est une protéine chaperonne associée au réticulum endoplasmique (86). Cette protéine ne se retrouve pas au FM; elle nous sert donc de contrôle de la pureté de l'isolement du FM. La tubuline est la composante principale du FM (87). Comme le FM a été isolé, la tubuline devrait être plus concentrée dans l'échantillon du FM que dans celui de l'IN. Sa présence sert à vérifier la présence du FM.

Afin de déterminer la région importante à l'association de STAU1 au FM, plusieurs mutants par délétion et par mutation ponctuelle de STAU1 sont utilisés. Le ratio (FM/IN) obtenu pour les protéines $\Delta 3$, $\Delta 4$, Δ TBD et 3*4* est essentiellement similaire à celui de STAU1, ce qui suggère que ces domaines n'affectent pas la localisation de STAU1 au FM (figure 17). Par contre, la protéine $\Delta 5$ se retrouve au FM en plus grande quantité que STAU1, ce qui montre que dsRBD5 ne participe pas non plus à l'interaction avec le FM. De tous les mutants, seule la protéine $\Delta 2$ a

un ratio diminué comparé à celui de STAU1. Cela montre que l'absence du dsRBD2 cause un déclin de la population de STAU1 au FM. Ces résultats montrent que le déterminant permettant la liaison de STAU1 au FM se trouve dans le dsRBD2.

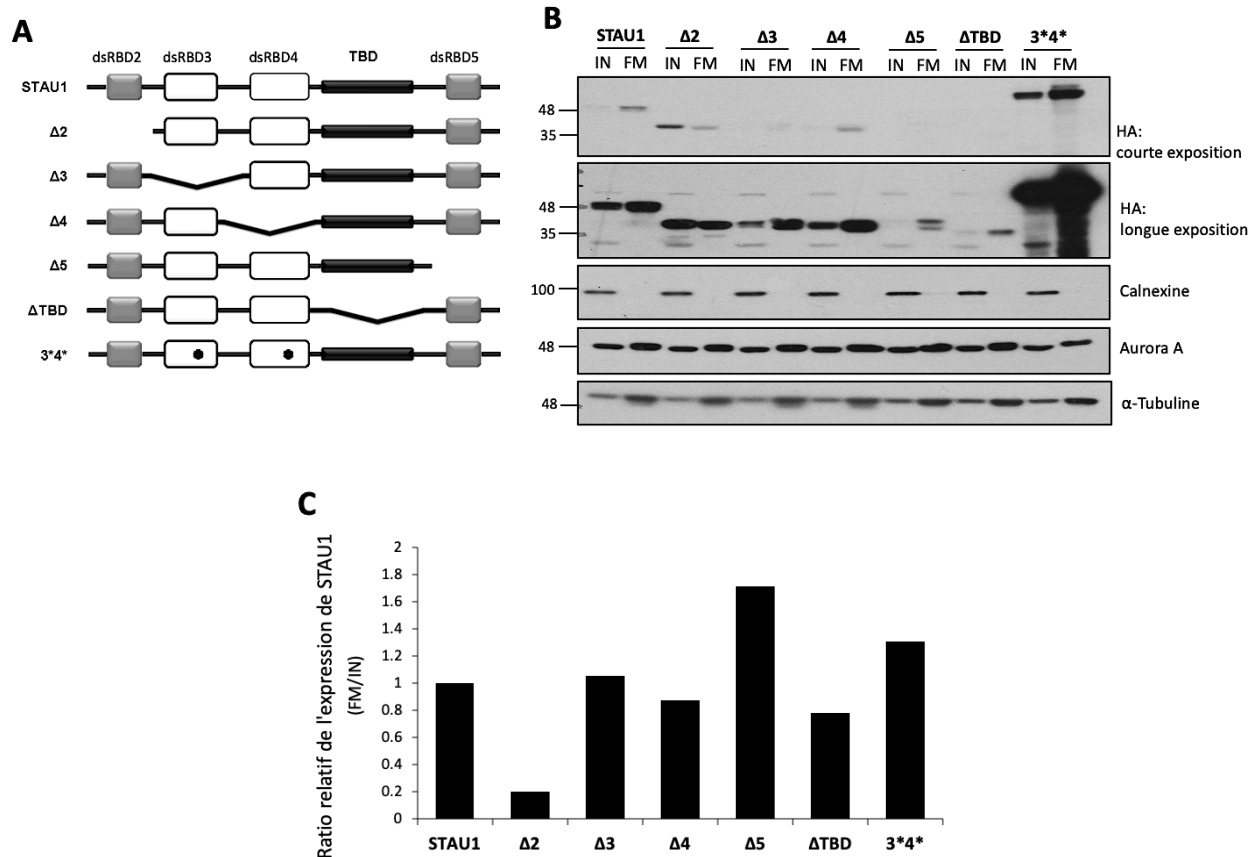


Figure 17. – Le domaine dsRBD2 est nécessaire pour la localisation de STAU1 au FM

(A) Schémas des constructions utilisés dans l'expérience. STAU1 : contient le gène de STAU1 endogène. $\Delta 2$: contient le gène STAU1 avec la délétion du dsRBD2. $\Delta 3$: contient le gène STAU1 avec la délétion du dsRBD3. $\Delta 4$: contient le gène STAU1 avec la délétion du dsRBD4. $\Delta 5$: contient le gène STAU1 avec la délétion du dsRBD5. Δ TBD : contient le gène STAU1 avec une délétion du TBD. 3*4* : contient le gène STAU1 avec des mutations dans les domaines dsRBD3 et dsRBD4. *, mutation ponctuelle qui abolit l'activité de la liaison à l'ARN de STAU1.

(B) Les cellules STAU1-KO HCT116 CRISPR 1.3 sont transfectées séparément avec les plasmides renfermant le gène STAU1 sauvage et les mutants fusionnés à une étiquette HA₃. Ces cellules sont synchronisées au paclitaxel pendant 16 à 18h avant l'isolement du FM. STAU1 et ses mutants sur le FM ainsi que dans l'IN sont ensuite détectés par WB avec les anticorps dirigés contre HA. Comme contrôles de dosage et de la purification du FM, les anticorps dirigés contre l' α - tubuline, Aurora A et la calnexine sont également utilisés.

(C) Le diagramme représente la moyenne de deux expériences indépendantes de la quantification du ratio (FM/IN) des bandes d'intérêts. Le ratio (FM/IN) permet de connaître la quantité de la protéine au FM par rapport à celle dans l'IN, ce ratio nous donne la possibilité de comparer la quantité entre STAU1 et ses mutants au FM (23).

Dans la figure 18, il est possible d'observer que le ratio (FM/IN) du $\Delta 2$ est significativement réduit comparé à celui de STAU1. Cela montre que l'absence du dsRBD2 cause une diminution de la population au FM et suggère que le dsRBD2 est le responsable majeur de la localisation de STAU1 sur le FM. Pour le vérifier, nous avons exprimé dsRBD2 ou dsRBD4-TBD comme témoin et analysé leur présence sur les préparations de fuseau mitotique. Le ratio (FM/IN) de la protéine dsRBD2 est plus grand que celui de la protéine STAU1, ce qui montre que le dsRBD2 a plus de facilité de se lier au FM que la protéine STAU1 complète. Ceci indique également que dsRBD2 est suffisant pour la localisation au FM. Il est aussi possible de noter que le ratio (FM/IN) du dsRBD4-TBD est plus faible que celui de STAU1, mais plus élevé que celui de $\Delta 2$. Cela indique le dsRBD4-TBD ne joue pas un grand rôle dans l'interaction entre STAU1 et le FM. Ces résultats confirment que le motif important permettant l'association de la protéine STAU1 au FM se trouve dans le dsRBD2.

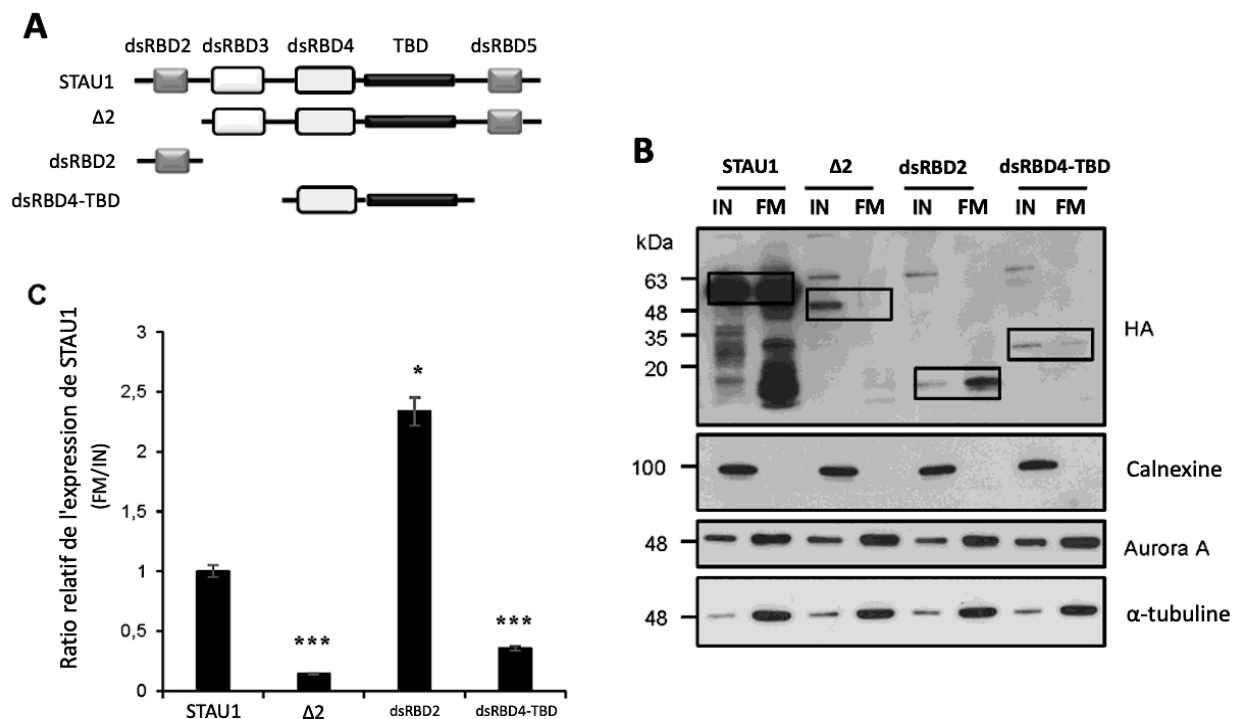


Figure 18. – Le dsRBD2 est suffisant pour la localisation de STAU1 au FM

(A) Schémas des constructions utilisés dans l'expérience. STAU1 : contient le gène STAU1 sauvage. $\Delta 2$: contient le gène de STAU1 avec une délétion du dsRBD2. dsRBD2 : contient seulement la région du dsRBD2 de STAU1. dsRBD4-TBD : contient seulement la région du dsRBD4 et du TBD de STAU1.

(B) L'expérience a été réalisée de la manière décrite dans la légende de la figure 17-B.

(C) Le diagramme représente la moyenne des trois expériences indépendantes de la quantification du ratio (FM/IN) des bandes encadrées. Veuillez référer à la légende de la figure 17-C pour plus de précision. Les analyses statistiques du test t de Student sont indiquées. Le rapport obtenu pour STAU1 était arbitrairement fixé à 1. Test t de Student (*) $p \leq 0,05$; (***) $p \leq 0,001$ (23).

Afin de déterminer le site spécifique dans le dsRBD2 qui permet l'association entre STAU1 et le FM, des plasmides contenant des délétions plus courtes ont été utilisés, incluant une délétion des 37 premiers aa ($\Delta 37$) et une délétion des 25 premiers aa ($\Delta 25$) du côté N-terminal de STAU1 (figure 19-A). L'expérience a été réalisée de la manière décrite dans la légende de la figure 17. Nous observons que le ratio (FM/IN) de la protéine $\Delta 37$ est similaire à celui de la protéine $\Delta 2$, ce qui montre que cette délétion de 37 aa cause une diminution de la population de STAU1 au FM autant qu'une délétion de 88 aa. Cela indique que le site permettant la localisation de STAU1 au FM se trouve dans les 37 premiers aa. De l'autre côté, le ratio (FM/IN) de la protéine $\Delta 25$ s'accroît grandement comparée à celui de la protéine $\Delta 2$ et s'approche plutôt du profil de STAU1 sauvage, ce qui indique que les premiers 25 aa ne contribuent pas à l'interaction entre STAU1 et le FM. Ces données montrent que le déterminant essentiel dans la localisation de STAU1 au FM se situe entre le 26^{ème} et le 37^{ème} aa.

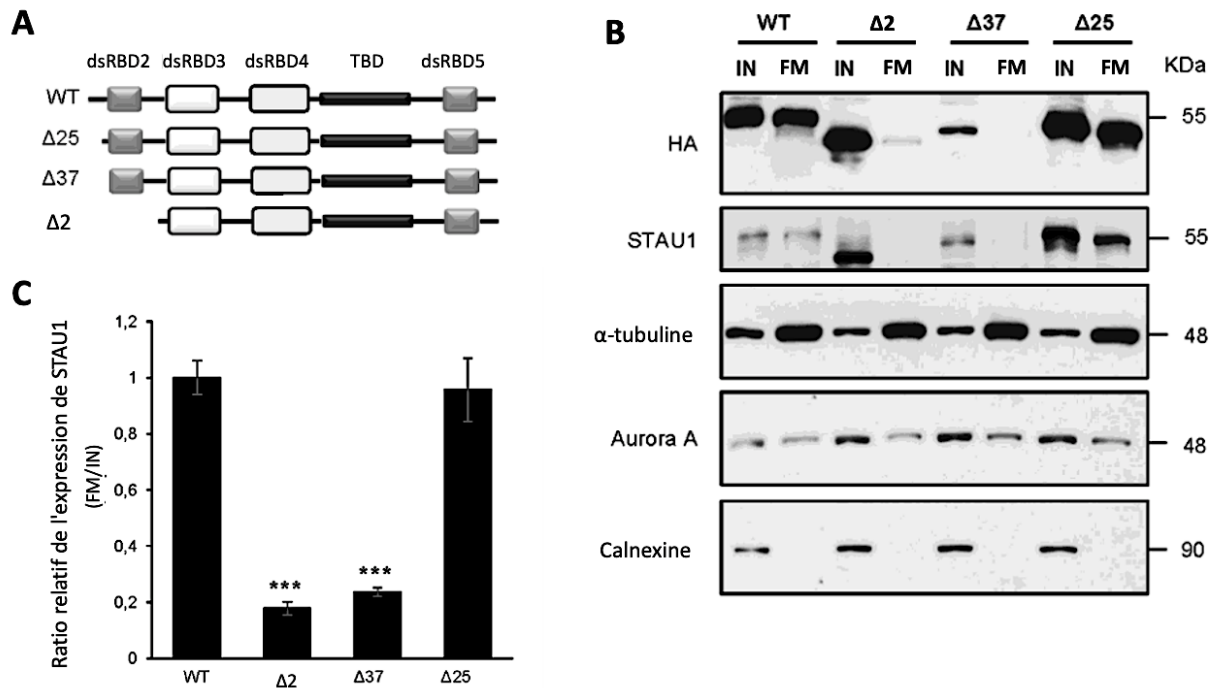


Figure 19. – Les aa 26 à 37 du côté N-terminal de STAU1 sont impliqués dans la localisation au FM

(A) Schémas des constructions utilisées dans l'expérience. $\Delta 25$: contient le gène STAU1 avec une délétion des 25 premiers aa du côté N-terminal. $\Delta 37$: contient le gène STAU1 avec une délétion des 37 premiers aa du côté N-terminal. Veuillez consulter la légende de la figure 18-A pour plus de référence.

(B) L'expérience a été réalisée de la manière décrite dans la légende de la figure 18-B

(C) Veuillez-vous référer à la légende de la figure 18-C pour plus de précision. Test t de Student (***) $p \leq 0,001$ (23).

Pour mieux identifier les aa responsables de l'interaction entre STAU1 et le FM, des plasmides renfermant des mutations ponctuelles dans des aa de la région 26-37 ont été analysés. Une mutation dans le gène de STAU1 a été produite par le remplacement des deux prolines en position 32 et 33 par deux alanines (PP32-33AA) (figure 20-A). De même, la phénylalanine 36 a été changée par une alanine (F36A) (figure 20-A). Ces protéines ont été analysées pour leur association au FM comme décrit dans la légende de la figure 18-B.

Le ratio (FM/IN) de la protéine PP32-33AA augmente par rapport à celui de la protéine $\Delta 2$, bien qu'il ne soit pas comparable à celui de STAU1 sauvage (figure 20-C). De même, le ratio (FM/IN) de la protéine F36A se rapproche de celui de la protéine $\Delta 2$, mais s'éloigne de celui de

STAU1 (figure 20-C). Cela montre que les aa PP32-33 et F36 contribuent tous deux partiellement à la localisation de STAU1 au FM.

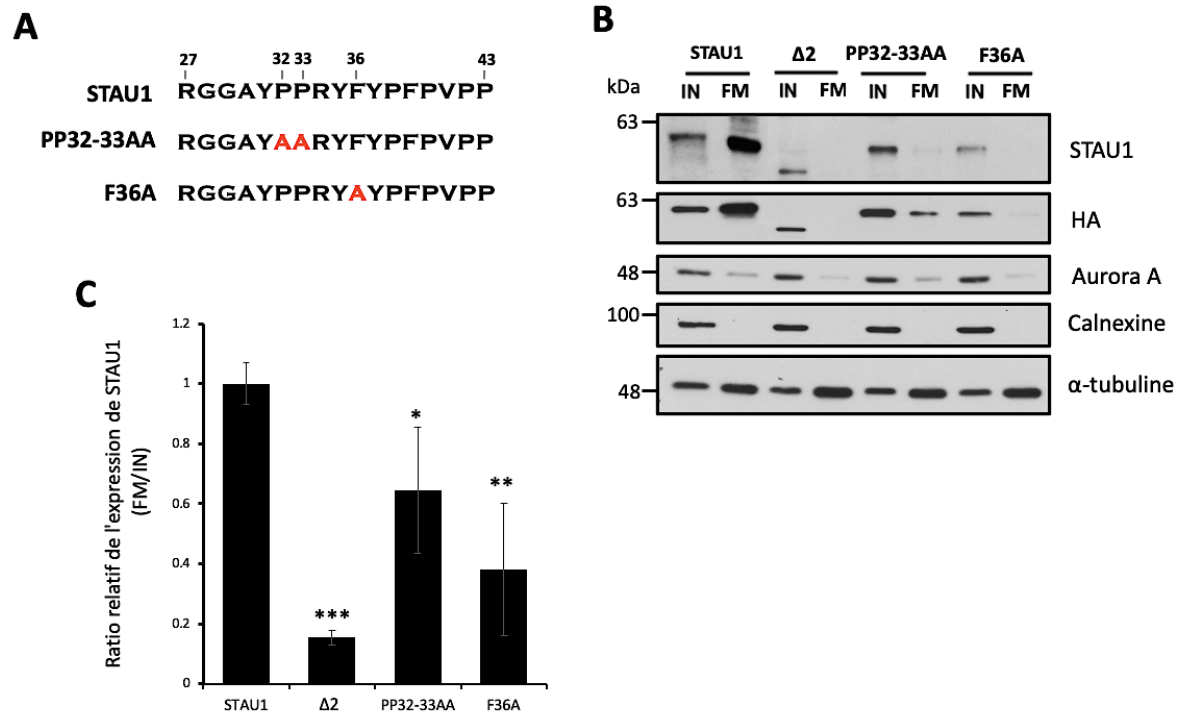


Figure 20. – La recherche des résidus importants pour l'association de STAU1 au FM

(A) Schémas des mutants ponctuels utilisés dans l'expérience. Les aa mutés sont en rouge.

(B) L'expérience a été réalisée de la manière décrite dans la légende de la figure 18-B

(C) Le diagramme représente la moyenne des quatre expériences indépendantes de la quantification du ratio (FM/IN) des bandes d'intérêt. Veuillez référer à la légende de la figure 18-C pour plus de précision. Test t de Student (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$.

DISCUSSION

STAU1 module l'expression d'ARNm codant pour des protéines essentielles à la transition G1/S du cycle cellulaire

STAU1 est reconnu comme un régulateur indispensable de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (19). Nous savons que la déplétion de STAU1 altère la prolifération cellulaire non cancéreuse en bloquant la transition G1/S (32). Alors, les auteurs ont exploré la possibilité que la déplétion de STAU1 affecte le niveau d'expression de protéines essentielles à la progression du cycle cellulaire. Et effectivement, ils ont identifié 35 gènes dont le niveau de leur transcrite est modulé lorsque la quantité de STAU1 est diminuée (32). Ces 35 gènes sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (32). Parmi ces gènes, la déplétion de STAU1 module le niveau de CDK4 et d'E2F1 qui sont une kinase et un facteur de transcription, respectivement, primordiaux à la transition G1/S irréversible du cycle cellulaire (54). Par hiCLIP, il a été montré que STAU1 se lie à un SBS situé dans le CDS de CDK4 et à un SBS situé dans le 3'UTR de l'ARNm E2F1 (33).

Par WB, nous constatons un accroissement d'expression de CDK4 chez les cellules dont l'expression de STAU1 est inhibée, mais son niveau d'ARNm est stable en absence ou en présence de STAU1. En revanche, la déplétion de STAU1 cause une diminution de la protéine E2F1. Nous remarquons également une réduction de son ARNm chez les cellules déplétées en STAU1. Cela signifie que STAU1 régule à plusieurs niveaux les voies qui contrôlent la décision de la transition G1/S du cycle cellulaire non tumorale.

STAU1 module l'expression de CDK4

Nous observons que le niveau de l'ARNm CDK4 ne change pas chez les cellules témoins vs les cellules déplétées en STAU1, il reste stable. En revanche, le niveau de la protéine CDK4 augmente en absence STAU1. Cela indique que STAU1 régule négativement l'expression de CDK4, sans moduler la stabilité de son ARNm chez les cellules non tumorales. Il est démontré que STAU1 interagit avec un SBS dans la CDS de l'ARNm CDK4 (33). Nos résultats suggèrent que par sa liaison

dans le CDS de l'ARNm CDK4, STAU1 cause une inhibition de la traduction en bloquant physiquement la machinerie de la traduction, sans déclencher la dégradation de l'ARNm CDK4, ce qui explique alors une réduction de l'expression de la protéine CDK4 et la stabilité de son ARNm. Ceci est consistant avec une étude à large échelle qui montre que la liaison de STAU1 au CDS réduit la traduction des messagers liés (33).

Pour étudier l'interaction entre STAU1 et son SBS sur l'ARNm CDK4, nous avons introduit les mutations à l'intérieur du SBS d'un plasmide qui contient la CDS de CDK4 fusionnée à une étiquette HA sous le contrôle du promoteur CMV afin d'interrompre la liaison de STAU1 à son SBS. Malheureusement, après plusieurs essais, ces constructions ne s'expriment toujours pas. Les cellules et notre protocole de transfection semblent valides vu que le contrôle de transfection (GFP sous le contrôle du promoteur RSV) s'exprime très bien. Il est possible que le promoteur et/ou le plasmide utilisé dans l'étude ne soient pas fonctionnels. Nous devons recloner les constructions de CDK4 dans un nouveau vecteur d'expression.

STAU1 module l'expression d'E2F1 par sa liaison au 3'UTR

Chez les cellules non tumorales

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la présence de STAU1 régule positivement l'expression de la protéine E2F1, ce qui corrèle avec notre hypothèse. Cette régulation est, en effet, dépendante de la liaison de STAU1 à un SBS localisé dans le 3'UTR de l'ARNm E2F1. Il est connu que STAU1 possède une interaction directe avec les ribosomes (49). Nous proposons alors que la liaison de STAU1 à l'ARNm E2F1 permet le rapprochement entre l'ARNm et les ribosomes, ce qui favorise la traduction de l'ARNm E2F1 augmentant son niveau protéique. Notre laboratoire a également observé qu'E2F1 se lie au promoteur du gène de STAU1 et augmente sa transcription (32). Ces résultats montrent que STAU1 induit l'expression d'E2F1 en se liant au SBS dans le 3'UTR de l'ARNm E2F1. E2F1 à son tour, comme facteur de transcription, augmente la transcription de STAU1, formant une boucle de rétroaction positive qui contribue au passage de la transition G1/S. Cette boucle favorise donc la prolifération cellulaire. Cette boucle est probablement renforcée par d'autres boucles qui impliquent autant E2F1 que STAU1. Effectivement, il a été montré que STAU1 se lie au 5'UTR de l'ARNm c-myc et améliore sa

traduction (31). C-myc est un gène régulateur et un proto-oncogène qui code pour un facteur de transcription menant à des changements coordonnés du niveau d'expression des familles de gènes qui entraînent une prolifération cellulaire accrue (88). Plus spécifiquement, c-myc augmente la transcription d'E2F1, donc le niveau de la protéine E2F1, ce qui renforce la boucle de rétroaction positive (32). Cela permet le passage de la transition G1/S et favorise la croissance cellulaire non cancéreuse.

Chez les cellules tumorales

Nous observons également que STAU1 favorise l'expression de la protéine E2F1 en interagissant avec son 3'UTR chez les cellules cancéreuses. La délétion de STAU1 cause une réduction du niveau de la protéine E2F1, ce qui devrait altérer la transition G1/S conduisant à une diminution de la progression cellulaire. Cependant, il a été rapporté que la prolifération cancéreuse n'est aucunement affectée par la délétion de STAU1 (19). Cela montre que l'abaissement du niveau d'E2F1 médiée par la déplétion de STAU1 ne joue pas un rôle dans la transition G1/S des cellules cancéreuses ni dans la prolifération tumorale. Ces observations suggèrent que les cellules cancéreuses ont trouvé un moyen de contourner ce point de contrôle et de continuer leur prolifération, vu que dans les cellules cancéreuses, les protéines pRB, p53 et autres protéines des points de contrôle sont souvent absentes ou inactives (89). Le besoin des cellules cancéreuses en E2F1 est donc probablement différent que celui des cellules non cancéreuses. En revanche, il a été montré que la surexpression de STAU1 altère la prolifération des cellules tumorales en bloquant l'entrée en mitose (19). L'analyse des données à large échelle montre qu'en général l'expression de STAU1 est plus élevée chez les cellules tumorales que chez les cellules non tumorales (90). Ceci est en accord avec nos résultats qui montrent que STAU1 est un régulateur positif des points de transition du cycle cellulaire et qu'elle régule positivement l'expression de c-myc, E2F1 et mTOR. Une plus grande expression de STAU1 favorise donc la prolifération tumorale (32,48). Cependant, chez les cellules cancéreuses, la surexpression de STAU1 entraîne la mort cellulaire (19). Il est probable que la surexpression de STAU1 change l'équilibre fragile qu'elle contrôle entre l'expression des gènes pro- et anti-prolifératifs et des gènes pro- et anti-apoptotiques et que le nouvel équilibre tend vers la mort cellulaire. D'ailleurs, l'analyse des cohortes de patients montre qu'une forte expression de STAU1 dans les tumeurs est

associée à un taux de survie supérieure des patients après traitement (90). De même, il est connu que la surexpression d'E2F1 accroît l'apoptose chez les cellules cancéreuses du côlon humain, ce qui pourrait contribuer à la mort cellulaire lors de la surexpression de STAU1 chez les cellules tumorales, vu que ceci augmente le niveau d'E2F1 (91). Cela pourrait fournir une autre explication sur le déclin de la prolifération des cellules cancéreuses lors de la surexpression de STAU1.

En somme, nos résultats montrent que STAU1 contrôle l'expression des ARNm essentiels impliqués dans les prises de décisions lors de la transition G1/S du cycle cellulaire. Un mécanisme est indispensable pour la prolifération des cellules non tumorales. De l'autre côté, cette modulation d'expression des transcrits par STAU1 entraîne la morte cellulaire chez les cellules cancéreuses.

Les déterminants responsables de l'association de STAU1 au FM

L'importance du dsRBD2 dans la localisation de STAU1 au FM

STAU1 est une protéine multifonctionnelle qui lie des ARNm et qui contrôle le destin des ARNm qu'elle lie (19). Sa surexpression altère l'entrée en mitose des cellules cancéreuses, incluant celui des cellules HCT116, U2OS, HEK293 menant à leur prolifération cellulaire réduite (19). Il est connu que STAU1 s'associe au FM et y localise des ARNm pour contrôler leur séquestration et/ou leur traduction locale lors de la mitose. Ces ARNm sont essentiels au passage de la mitose et au développement des cellules filles (23). Le déterminant permettant l'association au FM est alors essentiel pour la fonction de STAU1, donc pour la prolifération cellulaire cancéreuse.

Le dsRBD2 ne peut pas se lier à des ARN comme le dsRBD3 et le dsRBD4, mais il a la capacité d'interagir avec les microtubules (24,25). De tous les domaines de STAU1, seule l'absence du dsRBD2 peut interrompre la localisation de STAU1 au FM. Les résultats de notre laboratoire montrent que la délétion du dsRBD2 cause une diminution considérable de la population de STAU1 au FM par rapport à celle de STAU1 sauvage chez les cellules cancéreuses humaines (23). Cela signifie que ce domaine joue un rôle important dans la liaison entre STAU1 et le FM. Maintenant, nous observons également que le dsRBD2 seul se lie au FM à un niveau comparable à celui de STAU1 sauvage. Le dsRBD2 seul est suffisant pour la localisation au FM,

mais pas les autres domaines de STAU1. Le dsRBD4-TBD a la capacité de lier l'ARNm et d'associer à la tubuline respectivement (24). Le dsRBD4-TBD constitue le domaine minimal qui permet l'association protéine-protéine entre STAU1 et les ribosomes. Ces deux domaines seuls sont suffisants pour s'associer aux ribosomes, mais l'activité de liaison à l'ARN du dsRBD3 est nécessaire pour une association complète (49). Néanmoins, le dsRBD4-TBD se localise peu au FM comparé à dsRBD2. Cela montre que le dsRBD4-TBD ne joue pas un grand rôle dans l'interaction de STAU1 au fuseau mitotique, et que STAU1 ne se lie pas le FM via son association aux ribosomes. Ces données confirment que le dsRBD2 est le responsable majeur de l'interaction de STAU1 avec le FM, cela montre l'importance de ce domaine dans la fonction de STAU1 qui lui permet d'être un régulateur clé de l'entrée en mitose des cellules tumorales.

La région permettant la localisation de STAU1 au FM

Il est connu que la boucle d'insertion très conservée inter-espèce et riche en prolines et en aa aromatiques du dsRBD2 est essentielle pour la localisation de l'ARNm oskar aux microtubules chez la drosophile. Cette boucle située entre les 27^{ème} et 43^{ème} aa est également présente chez l'humain (74,25). Dans notre cas, nous constatons que le $\Delta 37$ est localisé faiblement au FM. Sa quantité se rapproche à celle du $\Delta 88$ qui est le contrôle négatif pour cette étude. Ceci suggère que les 38^{ème}-88^{ème} résidus du côté N-terminal de STAU1 ne participent pas dans l'interaction de STAU1 au FM et que les résidus importants dans cette interaction se situent dans les 37 premiers aa du côté N-terminal de STAU1. Nous remarquons également que le $\Delta 25$ se trouve en grand nombre au fuseau mitotique. Sa quantité se rapproche fortement de celle observée avec STAU1 sauvage, ce qui nous indique que la région entre le 1^{er} et le 25^{ème} aa ne contribue pas non plus à la liaison au FM. En somme, nos observations montrent que les résidus jouant un rôle majeur dans la localisation de STAU1 au FM se situent entre le 26^{ème} et le 37^{ème} aa inclusivement du côté N-terminal de la protéine STAU1, cette région se trouve à l'intérieur de la boucle d'insertion. Ces résultats concordent donc avec les travaux faits chez la drosophile.

Les résidus spécifiques permettant la localisation de STAU1 au FM

Pour identifier les résidus spécifiques qui participent à la localisation de STAU1 au FM, quelques aa importants sont mutés pour une alanine qui n'est pas particulièrement hydrophobe

ou polaire. L'alanine est non réactive; elle s'implique donc rarement dans la fonction de la protéine (92). Les mutations par une alanine servent donc à déterminer l'importance des résidus dans la fonction de STAU1. La proportion de la protéine mutée, PP32-32AA, augmente sur le FM comparé à $\Delta 88$, mais loin d'être au même niveau que STAU1. Cela signifie que PP32-32AA joue un rôle partiel dans l'association de STAU1 sur le FM. La localisation du mutant F36 au FM est plus importante par rapport à celle du $\Delta 88$, mais moins que celle de STAU1. Ceci suggère que le PP32-32AA et le F36 participent à la localisation de STAU1 au FM, mais que leur absence n'est pas suffisante pour détruire complètement l'interaction. Ces résidus se trouvent dans la région très conservée inter-espèce qui est située dans la boucle d'insertion du dsRBD2 (74,25). Les acides aminés P32, P33 et F36 sont très conservés à travers plusieurs espèces, y compris chez l'humain, la souris, la drosophile, le c.elegans, le gallus gallus, le xenopus laevis et le pongo abelii (25, 93, 94, 95). Ce fait nous conduit à soupçonner que c'est la somme de ces résidus qui contrôle l'interaction, et non seulement un résidu en particulier. Une proline est un aa non polaire et comprenant un hétérocycle, alors qu'une phénylalanine, également non polaire, est un aa aromatique (96,97). Nous soupçonnons que le remplacement de ces aa pourrait perturber directement l'interaction avec le FM. Cependant, il est également possible que la mutation de ces résidus cause une instabilité dans la structure de la protéine STAU1. Ces mutations peuvent influencer le repliement de la protéine qui résulte en plusieurs conformations possibles. Cette instabilité structurale peut à son tour altérer la localisation de STAU1 au FM. Cela explique donc la grande variation dans les données. Bref, les PP32-33 et F36 sont des résidus importants dans la localisation de STAU1 sur le FM par leur interaction directe avec le FM ou par un changement de structure de STAU1. Ces données correspondent à notre hypothèse puisque les PP32-33 et F36 se situent dans la boucle d'insertion très conservée.

CONCLUSION

STAU1 joue un rôle majeur dans la localisation, le transport, la dégradation, la traduction, et l'épissage des ARNm (19). Dans les cellules non cancéreuses, la déplétion de STAU1 cause un blocage de la transition G1/S. Chez ces cellules, STAU1 module l'expression des ARNm primordiales au passage de la transition G1/S en se liant à leur SBS. Elle favorise donc la prolifération cellulaire non tumorale. Étonnamment, sa déplétion n'a aucun effet sur la prolifération des cellules cancéreuses (19). En revanche, la surexpression de STAU1 interfère avec l'entrée en mitose des cellules tumorales, causant une diminution de leur prolifération cellulaire (19). De plus, l'association de STAU1 au FM permet le transport d'ARNm sur le FM et leur séquestration et/ou traduction durant la mitose. Une modulation de l'expression de STAU1 pourrait donc affecter différenciellement le niveau des ARN, ce qui affecte l'équilibre de la régulation post-transcriptionnelle des transcrits essentiels dans les points de contrôle du cycle cellulaire. La modification des profils d'expression et/ou des fonctions de STAU1 peut alors entraîner une prolifération cellulaire anormale et contribuer au développement du cancer. En somme, STAU1 participe à la régulation de la progression du cycle cellulaire autant chez les cellules non tumorales que chez les cellules tumorales avec des fonctions spécifiques dans chacune des deux lignées cellulaires (figure 21). La compréhension de la régulation médiée par STAU1 s'avère donc une cible potentielle thérapeutique spécifique contre le cancer. Une future étude serait de définir les partenaires qui permettent la liaison de STAU1 au FM et de caractériser les domaines d'interaction de STAU1 et du partenaire sur le FM. Il serait également intéressant d'identifier les partenaires protéiques de STAU1 requis pour la fonction de STAU1 lors de la mitose et de la transition G1/S chez les cellules cancéreuse et non cancéreuse. Ceci nous permettrait de comprendre davantage les différents mécanismes de STAU1 chez les cellules tumorales vs les cellules non tumorales. Il serait aussi intéressant de bien caractériser le régulon d'ARN contrôlé par STAU1 qui permet la régulation des phases de transition et de la prolifération cellulaire.

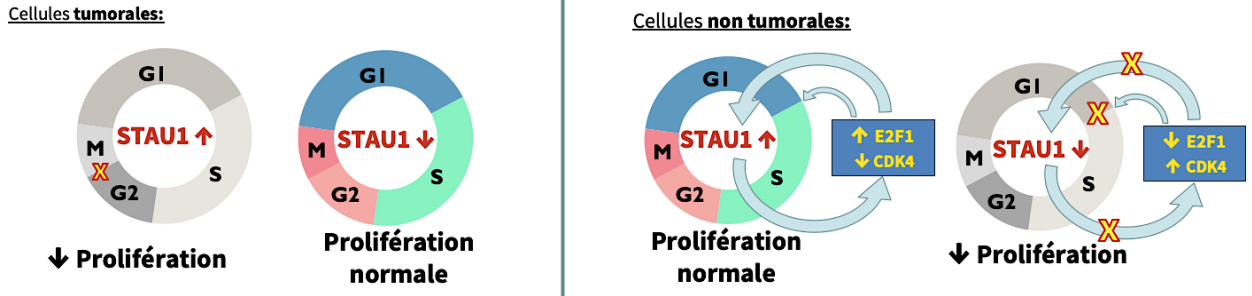


Figure 21. – Les fonctions spécifiques de STAU1 dans les cellules tumorales vs non tumorales

La déplétion/surexpression de STAU1 provoque des conséquences opposées sur la prolifération cellulaire chez les cellules tumorales et les cellules non tumorales. Les flèches (↑ ou ↓) représentent le niveau protéique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

La culture cellulaire

Les cellules HCT116 et les cellules hTert-RPE1/HEK293 sont cultivées dans du milieu McCoy's et DMEM (Wisent) respectivement contenant 10% de sérum bovin fœtal (Wisent), 20 mM de glutamine (Wisent) et 1% de pénicilline (Wisent) à 37 °C dans un atmosphère contenant 5% de CO₂.

La transfection

La transfection des plasmides dans des cellules est faite avec un ratio (1:2,5) de plasmide : agent transfectant Lipofectamine 2000 (Invitrogen), selon le protocole du manufacturier.

L'infection

Les cellules HEK293 sont cultivées dans une boîte de Petri de 10 cm contenant 9 mL du milieu de culture. Lors de la transfection, les cellules sont à une confluence de 60-70%. La solution de transfection composée de 0.248 M de CaCl₂, 15 µg de plasmide d'expression (shARN), et 7.5 µg de plasmide d'encapsidation (helper Ψa) pour un volume total de 500 µL est ajoutée goutte à goutte à 500 µL de 2X HBS (208 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Dextrose, 50 mM Heps à pH 7,05) en vortexant lentement. Le mélange est ensuite ajouté à la boîte de Petri des cellules HEK293. Ces cellules sont ensuite incubées pendant la nuit à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Seize heures à vingt plus tard, le sodium butyrate est ajouté dans la boîte de Petri à une concentration finale de 10 nM. Le milieu de culture est remplacé six à huit heures plus tard par 8 mL du milieu frais et les cellules sont incubées pendant la nuit à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le surnageant de culture est alors récupéré et remplacé par 8 mL de milieu frais. Les cellules hTert-RPE1 à 30-40% de confluence sont infectées avec un mélange contenant 8 ml de surnageant récupéré (filtré à 0.45 µm), 2 mL du milieu frais et 4 µg/mL comme concentration finale de polybrène, puis incubées à 37 °C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Cette étape est répétée trois fois par intervalles de huit heures, vingt heures, et huit heures. Vingt heures après la troisième infection, la puromycine est ajoutée à la concentration finale de 0.008 µg/mL pour sélectionner les cellules infectées.

La quantification de STAU1 sur le FM

Les plasmides exprimant les gènes STAU1-HA₃, STAU1^{Δ88}-HA₃ (Δ2), STAU1^{Δ3}-HA₃, STAU1^{Δ4}-HA₃, STAU1^{ΔTBD}-HA₃, STAU1^{Δ5}-HA₃, STAU1^{3*4*}-HA₃, STAU1^{Δ37}-HA₃, STAU1^{Δ25}-HA₃, STAU1^{PP32-33AA}-HA₃, STAU1^{F36A}-HA₃, dsRBD2-HA₃ ou dsRBD4-TBD-HA₃ sont dérivés du vecteur pCDNA₃RSV (figure 22). Ces plasmides et les cellules STAU1-KO HCT116 CR1.3 sont disponibles dans le laboratoire et ils sont décrits dans Hassine *et al.*, 2020 (23). Les plasmides sont transfectés dans les cellules STAU1-KO HCT116 CR1.3 à raison de 6 µg pour les plasmides codant les mutants de délétion, 5 µg pour les plasmides exprimant les mutants ponctuels ou dsRBD4-TBD-HA₃, 9 µg pour le plasmide contenant dsRBD2-HA₃ et 10 µg pour le plasmide renfermant le gène STAU1-HA₃. Lorsque les cellules transfectées atteignent une confluence d'environ 70-75%, 100 nM de paclitaxel (Sigma Aldrich) est ajouté puis les FM sont prélevés seize à dix-huit heures plus tard. L'isolation des FM se fait selon le protocole de Silljé *et al.*, 2006 (84), avec quelques modifications. Pour chaque boîte de Petri de 15 cm, nous avons incubé les cellules dans 5 mL de tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, et 1,8 mM KH₂PO₄) contenant 2 µL/mL de Latrunculine B et 5 µL/mL de Paclitaxel, puis lavé les cellules avec 10 mL de tampon faible en ions qui comprend 1 mM de Pipes pH6,9 et 5 µL/mL de Paclitaxel dilué dans de l'eau ultrapure, et finalement lysé les cellules dans 11 mL du tampon de lyse. Pour le tampon de lyse, nous utilisons celui décrit dans la publication de Silljé *et al.*, 2006, mais ajoutons un comprimé de cocktail d'inhibiteurs de protéases avec EDTA (Roche) pour 50 mL de tampon ou le cocktail d'inhibiteurs de protéases usage unique (Thermo Scientific). À l'étape finale, les échantillons sont resuspendus dans du Tris-SDS constituant 25 mM de Tris dans du SDS 1% avec un pH de 7,5. L'expression des protéines dans les extraits purifiés de FM et de lysat cellulaire est détectée par buvardage de type Western en utilisant 10 µg de protéines totales pour chaque échantillon. STAU1 et les mutants sont migrés sur des gels de polyacrylamide 10%. Par contre, dsRBD2-HA₃ et dsRBD4-TBD-HA₃ sont spécialement migrés dans des gels de polyacrylamide 14% contenant EDTA et glycérol à 100 V avec 0,08 A dû à leur petite taille.

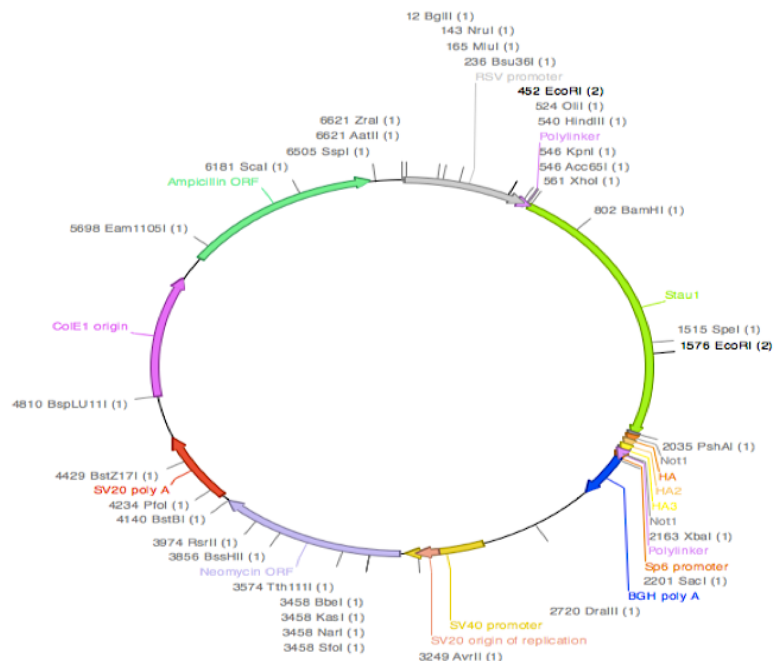


Figure 22. – Le schéma du plasmide dérivé du vecteur pCDNA₃ RSV renfermant le gène de STAU1

Le gène de STAU1 est inséré dans le site de polyclonage du vecteur pCDNA₃ comportant un promoteur RSV.

WB

Chaque échantillon est migré à travers des gels de polyacrylamide à 120 V et 0,08 A dans un tampon de migration contenant 24,76 mM de Tris, 0.19 M de glycine, et 3,47 mM de SDS. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à 180 V avec 0,28 A pendant 1,5 heures dans un tampon de transfert contenant 0.19 M de glycine, 33.02 mM de Tris, et 20% de méthanol. Les membranes sont par la suite trempées dans du PBS Tween (1.79 mM de Tween) contenant 10% de lait pendant 30 min, puis incubées avec les anticorps dirigés contre STAU1 (lot 175, décrit dans Hassine *et al.*, 2020 (23), α -tubuline, HA, calnexine (Santa Cruz), et Aurora A (Cell Signaling ou de Abcam) utilisée à une dilution de 1/1000 ainsi que l'anticorps anti-E2F1 (Santa Cruz) utilisé à une dilution de 300/1000 dans du lait 1% PBS Tween à 4°C pendant seize heures. Les membranes sont ensuite lavées 5 fois pendant 5 minutes sous agitation dans du PBS Tween. Après le lavage, les membranes sont incubées avec le deuxième anticorps (Dako - dilution recommandée par la compagnie), puis lavées encore 3 fois toutes les 5 minutes sous agitation avec du PBS Tween. Les membranes sont incubées dans le Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer) puis exposées numériquement au ChemiDoc™ MP Imaging System de BIO RAD ou

manuellement sur les films FUJI MEDICAL X-RAY à l'aide du révélateur Mini-Medical series d'AFP IMAGING. La quantification des protéines exprimées se fait avec le logiciel informatique ImageLab ou ImageJ.

Le clonage des plasmides exprimant CDK4

Un plasmide exprimant la CDS de CDK4 sous l'influence du promoteur CMV a été obtenu de addgene (Cdk4-HA, Plasmid #1876). Les mutations dans le SBS situé dans la CDS de CDK4 sont générées par PCR avec les amorces spécifiques; sens : ATAGGAGTCGGAGCGTACGGGACAGTGTACAAGGC 3' et anti-sens : 5' TTCAGCCACTGGCTCATATCGA 3'. Le produit de PCR est ensuite ligué par la ligase T4 (NEB) suivant le protocole du manufacturier.

Le clonage des constructions de luciférase

Un plasmide codant pour le 3'UTR du transcrit E2F1 fusionné en aval du gène RLuc qui exprime également le gène Fluc à partir d'un promoteur différent a été obtenu de addgene (psiCHECK2-E2F1 3'UTR, Plasmid #29468). À partir de ce plasmide, la mutation qui détruit le SBS d'E2F1 dans le plasmide MutR est généré par PCR avec les amorces spécifiques; sens : 5'GGGACCAATCTGCACTTTGATTTGCTTC 3' et anti-sens : 5' ACCCGCAGAGCAGTGGGGAGG 3'. Également à partir du plasmide provenant de addgene, le plasmide FRLuc est généré par une double digestion enzymatique de XhoI (Thermo Fisher) et NotI (NEB) pour sortir le 3'UTR du transcrit E2F1 selon le protocole du manufacturier. Les extrémités du plasmide FRLuc linéaire sont ensuite digérées par klenow (NEB) et liguées avec le T4 ligase (NEB) suivant le protocole du manufacturier.

La quantification de la luciférase

Les plasmides FRLuc-E2F1, FRLuc-MutR et FRLuc (0.3 µg) sont transfectés dans les cellules témoins (shNT et HCT116) ainsi que dans les cellules où l'expression de STAU1 est déplétée (shS1 et STAU1-KO HCT116 CR1.3). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Les cellules sont resuspendues dans 250 µL de PLB 1X (#E1019, Promega) avec un grattoir. Les lysats cellulaires sont ensuite transférées à des tubes Eppendorf de 1,5 ml, incubées 10 min à température pièce, et centrifugées 2 min à 13 000 rpm pour précipiter les

débris cellulaires. Puis, l'expression de Rluc et de Fluc est mesurée par un luminomètre (HIDEX). 35 μ L de chaque surnagent cellulaire est utilisé pour l'essai luciférase (#E1019, Promega) selon le protocole du fabricant. Après la normalisation sur l'expression de Fluc, nous comparons l'expression d'E2F1, MutR et FRLuc entre les cellules qui expriment STAU1 et celles déplétées de STAU1, ainsi qu'entre les cellules cancéreuses et les cellules non tumorales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cooper GM. Regulation of Transcription in Eukaryotes. *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [Internet]. 2000 [cité 2020 Jun 23]; Disponible au: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9904/>
2. Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T, Gerber AP. Post-transcriptional gene regulation: From genome-wide studies to principles. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Mar;65(5):798–813.
3. Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018 May;19(5):327–41.
4. Buckley PT, Eberwine J. RNA Binding Protein Methods. Dans: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2009 [cité 2020 Jun 13]. p. 383–8. Disponible au: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080450469008779>
5. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Mar;3(3):195–205.
6. Hazelrigg T. Subcellular RNA Localization. Dans: Brenner S, Miller JH, editors. *Encyclopedia of Genetics* [Internet]. New York: Academic Press; 2001 [cité 2020 Jun 13]. p. 1892–5. Disponible au: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270800011332>
7. Soheilypour M, Mofrad MRK. Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs. *Scientific Reports*. 2016 Nov 2;6(1):35380.
8. Kalsotra A, Xiao X, Ward AJ, Castle JC, Johnson JM, Burge CB, et al. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Dec 23;105(51):20333–8.
9. Giudice J, Xia Z, Wang ET, Scavuzzo MA, Ward AJ, Kalsotra A, et al. Alternative splicing regulates vesicular trafficking genes in cardiomyocytes during postnatal heart development. *Nat Commun*. 2014 May;5(1):3603.
10. Han H, Irimia M, Ross PJ, Sung H-K, Alipanahi B, David L, et al. MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature*. 2013 Jun;498(7453):241–5.
11. Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, Slobodeniuc V, O’Hanlon D, Sung H-K, et al. An Alternative Splicing Switch Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Reprogramming. *Cell*. 2011 Sep;147(1):132–46.

12. Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SSW, et al. Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations. *Neuron*. 2014 Feb;81(3):536–43.
13. Brinegar AE, Cooper TA. Roles for RNA-binding proteins in development and disease. *Brain Research*. 2016 Sep;1647:1–8.
14. Nussbacher JK, Yeo GW. Systematic Discovery of RNA Binding Proteins that Regulate MicroRNA Levels. *Molecular Cell*. 2018 Mar;69(6):1005-1016.e7.
15. Krenning G, Harmsen MC. MicroRNAs in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Dans: *MicroRNA in Regenerative Medicine* [Internet]. Elsevier; 2015 [cité 2020 Jun 16]. p. 1159–200. Disponible au: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124055445000447>
16. Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, et al. Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. Solomon MJ, editor. *MBoC*. 2002 Jun;13(6):1977–2000.
17. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jan;3(1):11–20.
18. Nourreddine S, Lavoie G, Paradis J, Ben El Kadhi K, Méant A, Aubert L, et al. NF45 and NF90 Regulate Mitotic Gene Expression by Competing with Staufen-Mediated mRNA Decay. *Cell Reports*. 2020 May;31(7):107660.
19. Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trépanier V, Mollet S, Fréchina C, et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res*. 2014 Aug 1;42(12):7867–83.
20. downregulation of the RNA-binding protein Staufen2 in response to DNA damage promotes apoptosis | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [Internet]. [cité 2019 Nov 15]. Disponible au: <https://academic.oup.com/nar/article/44/8/3695/2466231>
21. Beaujois R, Ottoni E, Zhang X, Gagnon C, HSine S, Mollet S, et al. The M-phase specific hyperphosphorylation of Staufen2 involved the cyclin-dependent kinase CDK1. *BMC Cell Biol* [Internet]. 2017 Jul 14 [cité 2019 Nov 15];18. Disponible au: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513041/>
22. Graber TE, Freemantle E, Anadolu MN, Hébert-Seropian S, MacAdam RL, Shin U, et al. UPF1 Governs Synaptic Plasticity through Association with a STAU2 RNA Granule. *J Neurosci*. 2017 Sep 20;37(38):9116–31.
23. Hassine S, Bonnet-Magnaval F, Benoit Bouvrette LP, Doran B, Ghram M, Bouthillette M, et al. Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle. *J Cell Sci*. 2020 Jun 23;jcs.247155.

24. Martel C, Dugré-Brisson S, Boulay K, Breton B, Lapointe G, Armando S, et al. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA*. 2010 Mar;16(3):585–97.
25. Micklem DR, Adams J, Grünert S, St Johnston D. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J*. 2000 Mar 15;19(6):1366–77.
26. Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, et al. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol*. 2008 May;28(9):2896–907.
27. Thomas MG, Tosar LJM, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci*. 2009 Feb 15;122(4):563–73.
28. Crawford Parks TE, Marcellus KA, Langill J, Ravel-Chapuis A, Michaud J, Cowan KN, et al. Novel Roles for Staufen1 in Embryonal and Alveolar Rhabdomyosarcoma via c-myc-dependent and -independent events. *Sci Rep*. 2017 Mar;7(1):42342.
29. Anderson J, Gordon A, McManus A, Shipley J, Pritchard-Jones K. Disruption of Imprinted Genes at Chromosome Region 11p15.5 in Paediatric Rhabdomyosarcoma. *Neoplasia*. 1999 Oct;1(4):340–8.
30. Blackwood E, Eisenman R. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991 Mar 8;251(4998):1211–7.
31. Ravel-Chapuis A, Crawford TE, Blais-Crépeau M-L, Bélanger G, Richer CT, Jasmin BJ. The RNA-binding protein Staufen1 impairs myogenic differentiation via a c-myc-dependent mechanism. Yamashita Y, editor. *MBoC*. 2014 Nov 15;25(23):3765–78.
32. Ghram M, Bonnet-Magnaval F, Hotea DI, Doran B, Ly S, DesGroseillers L. Staufen1 is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation Via the Control of E2F1 Expression. *Journal of Molecular Biology*. 2020 Jun;432(13):3881–97.
33. Sugimoto Y, Vigilante A, Darbo E, Zirra A, Militti C, D’Ambrogio A, et al. hiCLIP reveals the in vivo atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature*. 2015 Mar 26;519(7544):491–4.
34. Abrahamyan LG, Chatel-Chaix L, Ajamian L, Milev MP, Monette A, Clement J-F, et al. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Journal of Cell Science*. 2010 Feb 1;123(3):369–83.
35. Bondy-Chorney E, Crawford Parks TE, Ravel-Chapuis A, Jasmin BJ, Côté J. Staufen1s role as a splicing factor and a disease modifier in Myotonic Dystrophy Type I. *Rare Diseases*. 2016 Jan;4(1):e1225644.

36. Klinck R, Fourrier A, Thibault P, Toutant J, Durand M, Lapointe E, et al. RBFOX1 Cooperates with MBNL1 to Control Splicing in Muscle, Including Events Altered in Myotonic Dystrophy Type 1. de Munain AL, editor. PLoS ONE. 2014 Sep 11;9(9):e107324.
37. Ravel-Chapuis A, Bélanger G, Yadava RS, Mahadevan MS, DesGroseillers L, Côté J, et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. J Cell Biol. 2012 Mar 19;196(6):699–712.
38. Wan Y, Kertesz M, Spitale RC, Segal E, Chang HY. Understanding the transcriptome through RNA structure. Nat Rev Genet. 2011 Sep;12(9):641–55.
39. Ricci EP, Kucukural A, Cenik C, Mercier BC, Singh G, Heyer EE, et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. Nat Struct Mol Biol. 2014 Jan;21(1):26–35.
40. Schmid CW, Deininger PL. Sequence organization of the human genome. Cell. 1975 Nov;6(3):345–58.
41. Elbarbary RA, Li W, Tian B, Maquat LE. STAU1 binding 3' UTR IRALus complements nuclear retention to protect cells from PKR-mediated translational shutdown. Genes Dev. 2013 Jul 1;27(13):1495–510.
42. Häslér J, Samuelsson T, Strub K. Useful “junk”: Alu RNAs in the human transcriptome. Cell Mol Life Sci. 2007 Jul;64(14):1793–800.
43. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. Nature. 2011 Feb;470(7333):284–8.
44. Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. Cell. 2005 Jan 28;120(2):195–208.
45. Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). Trends Biochem Sci. 2004 Mar;29(3):111–8.
46. Corda D, Di Girolamo M. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW. EMBO J. 2003 May 1;22(9):1953–8.
47. Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. Nucleic Acids Research. 2005 Aug 26;33(15):4797–812.
48. Staufen blocks autophagy in neurodegeneration | bioRxiv [Internet]. [cité 2019 Nov 15]. Disponible au: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/659649v1.full>
49. Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. Biochem J. 2002 Aug 1;365(Pt 3):817–24.

<https://portlandpress.com/biochemj/article/365/3/817/40231/Molecular-mapping-of-the-determinants-involved-in?searchresult=1>

50. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Aug;14(8):518–28.
51. Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, et al. The E2F1–3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature.* 2001 Nov;414(6862):457–62.
52. Morgan DO. *The Cell Cycle: Principles of Control.* New Science Press; 2007. 328 p.
53. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):298–306.
54. Müller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* 2001 Feb 1;15(3):267–85.
55. Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019 Jun;19(6):326–38.
56. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013 Aug;140(15):3079–93.
57. Lim S, Kaldis P. Loss of Cdk2 and Cdk4 Induces a Switch from Proliferation to Differentiation in Neural Stem Cells. *STEM CELLS.* 2012 Jul;30(7):1509–20.
58. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet.* 1999 May;22(1):44–52.
59. Sheppard KE, McArthur GA. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Oct 1;19(19):5320–8.
60. Studzinski GP, Danilenko M. Differentiation and the Cell Cycle. Dans: *Vitamin D* [Internet]. Elsevier; 2005 [cité 2020 Aug 11]. p. 1635–61. Disponible au: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780122526879500966>
61. Wang Z, Xie Y, Zhang L, Zhang H, An X, Wang T, et al. Migratory localization of cyclin D2-Cdk4 complex suggests a spatial regulation of the G1-S transition. *Cell Struct Funct.* 2008;33(2):171–83.
62. Lee B, McArthur GA. CDK4 inhibitors an emerging strategy for the treatment of melanoma. *Melanoma Management.* 2015 Aug;2(3):255–66.

63. Ghram M, Bonnet-Magnaval F, Hotea DI, Doran B, Ly S, DesGroseillers L. Staufen1 is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation Via the Control of E2F1 Expression. *Journal of Molecular Biology*. 2020 Jun;432(13):3881–97
64. Sozzani R, Maggio C, Varotto S, Canova S, Bergounioux C, Albani D, et al. Interplay between Arabidopsis Activating Factors E2Fb and E2Fa in Cell Cycle Progression and Development. *Plant Physiol*. 2006 Apr;140(4):1355–66.
65. E2F1 E2F transcription factor 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 2019 Nov 15]. Disponible au: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1869>
66. Paik JC, Wang B, Liu K, Lue JK, Lin W-C. Regulation of E2F1-induced Apoptosis by the Nucleolar Protein RRP1B. *J Biol Chem*. 2010 Feb 26;285(9):6348–63.
67. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*. 1999 Dec 20;18(55):7873–82.
68. Attwooll C, Denchi EL, Helin K. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J*. 2004 Dec 8;23(24):4709–16.
69. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005 Apr 18;24(17):2810–26.
70. Inoshita S, Terada Y, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Regulation of the G1/S transition phase in mesangial cells by E2F1. *Kidney International*. 1999 Oct;56(4):1238–41.
71. Davidson JM, Duronio RJ. S Phase–Coupled E2f1 Destruction Ensures Homeostasis in Proliferating Tissues. *PLoS Genet* [Internet]. 2012 Aug 16 [cité 2019 Nov 16];8(8). Disponible au: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420931/>
72. Johnson DG. The paradox of E2F1: oncogene and tumor suppressor gene. *Mol Carcinog*. 2000 Mar;27(3):151–7.
73. Stark GR, Taylor WR. Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol Biol*. 2004;280:51–82.
74. double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1 isoform a [Homo - Protein - NCBI [Internet]. [cité 2020 May 17]. Disponible au: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_059348.2
75. Groisman I, Huang YS, Mendez R, Cao Q, Theurkauf W, Richter JD. CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell*. 2000 Oct 27;103(3):435–47.
76. Wilker EW, van Vugt MATM, Artim SA, Huang PH, Petersen CP, Reinhardt HC, et al. 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature*. 2007 Mar 15;446(7133):329–32.

77. Aviner R, Geiger T, Elroy-Stein O. Novel proteomic approach (PUNCH-P) reveals cell cycle-specific fluctuations in mRNA translation. *Genes & Development*. 2013 Aug 15;27(16):1834–44.
78. Blower MD, Feric E, Weis K, Heald R. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J Cell Biol*. 2007 Dec 31;179(7):1365–73.
79. Sharp JA, Plant JJ, Ohsumi TK, Borowsky M, Blower MD. Functional analysis of the microtubule-interacting transcriptome. *Mol Biol Cell*. 2011 Nov;22(22):4312–23.
80. Carron C, Balor S, Delavoie F, Plisson-Chastang C, Faubladiere M, Gleizes P-E, et al. Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *J Cell Sci*. 2012 Oct 1;125(Pt 19):4532–42.
81. Li S. Human 28s rRNA 5' terminal derived small RNA inhibits ribosomal protein mRNA levels [Internet]. *Biochemistry*; 2019 Apr [cité 2020 Jun 24]. Disponible au: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/618520>
82. Rashid F, Awan H, Shah A, Chen L, Shan G. Induction of miR-3648 Upon ER Stress and Its Regulatory Role in Cell Proliferation. *IJMS*. 2017 Jun 29;18(7):1375.
83. Hagio K, Furuya S, Nakamura J, Maruyama S, Shiraishi K, Shimizu H, et al. High miR-3687 Expression Affects Migratory and Invasive Ability of Oesophageal Carcinoma. *Anticancer Res*. 2019 Jan 2;39(2):557–65.
84. Silljé HHW, Nigg EA. Purification of mitotic spindles from cultured human cells. *Methods*. 2006 Jan;38(1):25–8.
85. Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005 Aug;37(8):1572–7.
86. Naidoo N. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. Dans: *Comprehensive Biotechnology* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 2020 Jul 3]. p. 217–27. Disponible au: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080885049000295>
87. Kline-Smith SL, Walczak CE. Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation. *Molecular Cell*. 2004 Aug;15(3):317–27.
88. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research*. 2012 Oct 15;18(20):5546–53.
89. Zhu L, Lu Z, Zhao H. Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. *Oncogene*. 2015 Aug;34(35):4547–57.

90. Damas ND, Marcatti M, Côme C, Christensen LL, Nielsen MM, Baumgartner R, et al. SNHG5 promotes colorectal cancer cell survival by counteracting STAU1-mediated mRNA destabilization. *Nat Commun.* 2016 Dec;7(1):13875.
91. Elliott MJ, Stilwell A, Dong YB, Yang HL, Wong SL, Wrightson WR, et al. C-terminal deletion mutant p21WAF1/CIP1 enhances E2F-1-mediated apoptosis in colon adenocarcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 2002 May;9(5):453–63.
92. Berlot CH. Use of Scanning Mutagenesis to Delineate Structure–Function Relationships in G Protein α Subunits. Dans: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2002 [cité 2020 Jul 7]. p. 455–68. Disponible au: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687902447337>
93. double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1 [*Gallus gallus*] - Protein - NCBI [Internet]. [cité 2020 Oct 8]. Disponible au: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001012849.1
94. double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1 [*Xenopus laevis*] - Protein - NCBI [Internet]. [cité 2020 Oct 8]. Disponible au: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001085239.1
95. double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1 [*Pongo abelii*] - Protein - NCBI [Internet]. [cité 2020 Oct 8]. Disponible au: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001126609.1
96. Anggono V, Robinson PJ. Dynamin. Dans: *Encyclopedia of Neuroscience* [Internet]. Elsevier; 2009 [cité 2020 Jul 7]. p. 725–35. Disponible au: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080450469013632>
97. Bhagavan NV, Ha C-E. Protein and Amino Acid Metabolism. Dans: *Essentials of Medical Biochemistry* [Internet]. Elsevier; 2015 [cité 2020 Jul 7]. p. 227–68. Disponible au: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166875000154>