

Université de Montréal



Faculté de Médecine

Thèse de Doctorat

La protéine Staufen1 contrôle la localisation des ARN spécifiques sur le fuseau mitotique dans les cellules de cancer colorectal humain HCT116

Par

Sami Hassine

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor (PhD)* en Biochimie

Spécialité : Génétique Moléculaire

Avril, 2021

© Sami Hassine, 2021

Université de Montréal
Faculté de Médecine
Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Cette thèse intitulée

La protéine Staufen1 contrôle la localisation des ARN spécifiques sur le fuseau
mitotique dans les cellules de cancer colorectal humain HCT116

Présentée par

Sami Hassine

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Président-rapporteur : Dr Gerardo Ferbeyre
Directeur de recherche : Dr Luc DesGroseillers
Membre du jury : Dr Pascal Chartrand
Examineur externe : Dr Benoît Chabot
Représentant du Doyen : Dr Pascal Roy

Résumé

La protéine de liaison à l'ARN double-brin Staufen1 (STAU1) est exprimée dans les cellules de mammifères de manière ubiquitaire. STAU1 est impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique grâce à sa capacité de lier les ARN et moduler leur épissage, leur transport et localisation, leur traduction ainsi que leur dégradation. Des études récentes de notre laboratoire indiquent que l'expression de STAU1 est régulée durant le cycle cellulaire, ayant une abondance maximale au début de la mitose. En prométaphase, STAU1 est lié à des ARNm codant pour des facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaires. De plus, des analyses protéomiques menées sur des cellules humaines ont permis d'identifier STAU1 comme un composant de l'appareil mitotique. Cependant, l'importance de cette association n'a pas été investiguée. Par ailleurs, il a été montré qu'une défaillance dans l'expression ou les fonctions de STAU1 pourrait contribuer au développement et l'accélération de plusieurs maladies débilitantes, dont le cancer. Dans cette thèse, nous avons montré la localisation de STAU1⁵⁵ sur le fuseau mitotique dans les cellules de cancer colorectal HCT116 et les cellules non transformées hTERT-RPE1. Nous avons également caractérisé le déterminant moléculaire impliqué dans l'interaction entre STAU1⁵⁵ et les microtubules mitotiques, soit la séquence située dans les 88 premiers acides aminés N-terminaux de RBD2, un domaine qui n'est pas requis pour l'activité de liaison à l'ARN de STAU1. Nous avons ainsi montré que la fraction de STAU1 enrichie sur le fuseau colocalise avec des ribosomes dans des sites actifs de traduction. De plus, notre analyse transcriptomique du fuseau mitotique montre que 1054 transcrits (ARNm, pré-ARNr, lncRNA et snoRNA) sont enrichis sur l'appareil mitotique. De façon intéressante, le knockout de STAU1 entraîne la délocalisation des pré-ARNr et de 154 ARNm codants pour des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine et la croissance

cellulaire. Bien que STAU1 n'est pas essentiel pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses HCT116, nos résultats mettent clairement en évidence l'implication de STAU1 dans la régulation des ARN spécifiques en mitose et suggèrent un nouveau rôle de cette protéine dans la progression mitotique et la cytokinèse par la régulation de la maintenance des pré-ARNr, la ribogenèse et/ou la reconstitution de l'enveloppe nucléaire.

Mots-clés: Staufen1, localisation, ARN, fuseau mitotique, division cellulaire, HCT116, régulation post-transcriptionnelle, RNA-Seq.

Abstract

Staufen1 (STAU1) is a double-stranded RNA-binding protein that is ubiquitously expressed in mammals and known for its involvement in the post-transcriptional regulation of gene expression such as splicing, transport and localization, translation, and decay. It has been demonstrated that STAU1 protein expression level is modulated through the cell cycle with peak abundance by the onset of the mitotic phase after which it is degraded. Genome-wide analysis revealed that in prometaphase, STAU1 bound with mRNAs code for factors implicated in cell differentiation, cell growth as well as for cell proliferation. Interestingly, previous large-scale proteomic studies identified STAU1 as a component of the human mitotic spindle apparatus. Altering STAU1 expression patterns or functions may lead to several debilitating human diseases including cancer. In this thesis, we further elucidated the localization of STAU1 at the mitotic spindle of the colorectal cancer HCT116 and the non-transformed hTERT-RPE1 cells. Next, we characterized the molecular determinant required for STAU1/spindle association within the first 88 N-terminal amino acids, a domain that is not required for the RNA binding activity. RNA-Seq analysis of purified mitotic spindles reveals that 1054 mRNAs as well as the precursor ribosomal RNA, lncRNAs and snoRNAs are enriched on spindles compared to cell extracts. Spindle-associated STAU1 partly co-localizes with ribosomes and active sites of translation. Interestingly, the knockout of STAU1 delocalizes pre-rRNA and 154 mRNAs coding for proteins involved in actin cytoskeleton organization and cell growth. Our results highlighting a role for STAU1 in mRNA trafficking to the spindle. These data demonstrate that STAU1 controls the localization of sub-populations of RNA during cell division and suggests a novel role of STAU1 protein in mitotic progression and cytokinesis by regulating pre-rRNA maintenance, ribogenesis and/or nucleoli reassembly.

Keywords: Staufen1, RNA, Localization, Post-transcriptional regulation, Mitotic spindle, RNA-Seq, Ribosomal RNA, HCT116.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et abréviations	18
Remerciements	27
1 Introduction.....	33
1.1 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique	35
1.1.1 Cycle de vie de l'ARNm	35
1.1.1.1 Maturation	35
1.1.1.1.1 Ajout de la coiffe	36
1.1.1.1.2 Épissage	36
1.1.1.1.3 Clivage et polyadénylation	37
1.1.1.2 Export nucléaire	39
1.1.1.3 Localisation des ARNm	40
1.1.1.3.1 Avantages	40
1.1.1.3.2 Processus impliquant la localisation des ARNm	41
1.1.1.3.2.1 Division cellulaire asymétrique	42

1.1.1.3.2.2 Développement embryonnaire.....	42
1.1.1.3.2.3 Migration cellulaire	43
1.1.1.3.2.4 Plasticité synaptique	44
1.1.1.3.3 Éléments de localisation des ARNm	46
1.1.1.3.3.1 Éléments cis (Zipcodes).....	46
1.1.1.3.3.2 Facteurs trans.....	46
1.1.1.3.4 Mécanismes de localisation des ARNm	47
1.1.1.3.4.1 Transport actif.....	48
1.1.1.3.4.2 Dégradation et stabilisation	51
1.1.1.3.4.3 Diffusion et ancrage.....	51
1.1.1.3.4.4 Transcription localisée.....	52
1.1.1.3.5 Structures cellulaires ciblées par la localisation des ARNm	54
1.1.1.3.6 Prévalence de la localisation des ARNm.....	55
1.1.1.3.6.1 Maladies neurodégénératives	55
1.1.1.3.6.2 Maladies neuromusculaires	56
1.1.1.3.6.3 Cancer.....	57
1.1.1.4 Complexes de transport et d'entreposage des ARN.....	58
1.1.1.4.1 Granules et particules de transport	58
1.1.1.4.2 Granules de stress	60
1.1.1.4.3 P-bodies	61

1.1.1.4.4	Vésicules extracellulaires	62
1.1.1.5	Facteurs influençant la stabilité des ARNm	63
1.1.1.5.1	Coiffage et polyadénylation.....	64
1.1.1.5.2	ARN non codants.....	64
1.1.1.5.3	ARE « <i>Adenylated-Uridylated Rich Elements</i> ».....	65
1.1.1.5.4	IRES « <i>Internal Ribosomal Entry Site</i> ».....	67
1.1.1.6	Traduction	69
1.1.1.6.1	Phase d'Initiation.....	69
1.1.1.6.2	Phase d'Élongation.....	70
1.1.1.6.3	Phase de Terminaison et recyclage.....	70
1.1.1.7	Mécanismes de surveillance des ARNm	72
1.1.1.7.1	NMD « <i>Nonsense-Mediated Decay</i> »	72
1.1.1.7.2	NGD « <i>Non-Go Decay</i> »	72
1.1.1.7.3	NSD « <i>Non-Stop Decay</i> »	73
1.1.2	Régulation post-transcriptionnelle du cycle cellulaire et de la mitose	75
1.1.2.1	Aperçue sur le cycle cellulaire	75
1.1.2.1.1	Interphase.....	75
1.1.2.1.2	Mitose	76
1.1.2.2	Les ARNm dans le cycle cellulaire	79
1.1.2.3	Localisation des ARNm au niveau de l'appareil mitotique	83
1.1.3	Protéine de liaison à l'ARN (RBP)	88

1.1.3.1	RBP, majeurs régulateurs post-transcriptionnels	88
1.1.3.2	Domaines de liaison à l'ARN.....	90
1.1.3.3	RBP dans le cycle cellulaire.....	94
1.1.3.4	RBP localisée sur le fuseau mitotique.....	96
1.2	Staufen1, un effecteur de la régulation post-transcriptionnelle	97
1.2.1	Description générale et structure.....	97
1.2.2	Distribution intracellulaire de STAU1	99
1.2.3	Association de STAU1 aux divers organites.....	100
1.2.3.1	Réticulum endoplasmique rugueux (RER).....	100
1.2.3.2	Polyribosomes	100
1.2.3.3	Granules de stress (GS)	101
1.2.3.4	P-bodies	102
1.2.3.5	Microtubules.....	102
1.2.4	Sites de liaison reconnus par STAU1 ou SBS « <i>Staufen-Binding Sites</i> »	103
1.2.4.1	SBS Intramoléculaires	105
1.2.4.2	Sites intermoléculaires	105
1.2.5	Fonctions cellulaires impliquant STAU1	106
1.2.5.1	Épissage alternatif et export nucléaire.....	107
1.2.5.2	Développement embryonnaire et différenciation cellulaire	108
1.2.5.3	Plasticité synaptique.....	109
1.2.5.4	Activation et répression de la traduction	110
1.2.5.5	SMD « <i>Staufen-Mediated Decay</i> »	113
1.2.5.6	Prolifération cellulaire	115

1.2.5.7	Progression tumorale.....	117
1.3	Hypothèse et objectifs de recherche.....	120
2	Résultats.....	123
2.1	Article 1: Characterization of STAU1 CRISPR-knockout in the colorectal cancer cell line HCT116.....	123
	ABSTRACT.....	125
	INTRODUCTION	126
	RESULTS AND DISCUSSION	128
	MATERIALS AND METHODS.....	134
	ACKNOWLEDGMENTS	137
	FIGURES AND LEGENDS.....	138
	REFERENCES	146
	SUPPLEMENTAL TABLES	151
2.2	Article 2: Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle	161
	SUMMARY STATEMENT	163
	ABSTRACT.....	164
	INTRODUCTION	165
	RESULTS	168
	DISCUSSION	175
	MATERIAL AND METHODS.....	181
	ACKNOWLEDGMENTS	187

REFERENCES	188
FIGURES	195
SUPPLEMENTAL TABLES	209
SUPPLEMENTAL FIGURES.....	211
3 Discussion générale	225
4 Perspectives :	234
5 Conclusion	235
Références bibliographiques.....	236

Liste des tableaux

Article 1 - Characterization of STAU1 CRISPR-knockout in the colorectal cancer cell line

HCT116

Table S1 - List of genes that are upregulated in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells 151

Table S2 - List of genes that are downregulated in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells..... 154

Table S3 - Gene ontology of dysregulated genes in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells..... 158

Article 2 - Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA

populations to the spindle

Table 1-Total number of individual transcripts and of transcripts per million (TPM) across RNA biotypes. 194

Table S1 - RNA-Seq of whole cell (Input) and spindle preparations (MS) isolated from WT (HCT) and STAU1-KO (CR1_3) cells..... 209

Table S2 - List of genes that are misregulated in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells (Input)..... 209

Table S 3 - Spindle-enriched RNAs in WT and STAU1-KO HCT116 cells 209

Table S 4 - Number of individual transcripts and of transcripts per million (TPM) across RNA biotypes of spindle-enriched RNAs. Enrichment of TPM in mitotic spindle compared to input is shown..... 209

Table S 5 - Gene ontology (GO) of spindle-enriched RNAs in HCT116 cells (Metascape Gene Annotation & Analysis Resource)..... 210

Table S 6 - Downregulated RNAs in spindle preparations of STAU1-KO cells compared to WT cells..... 210

Table S 7 - Gene ontology (GO) of downregulated RNAs in spindle preparations of STAU1-KO cells compared to WT cells (Metascape Gene Annotation & Analysis Resource).. 210

Liste des figures

Introduction

Figure 1. –	Aperçu global de la maturation et de l'export nucléaire des ARNm.....	38
Figure 2. –	Localisation des ARNm dans différents organismes.....	45
Figure 3. –	Schémas de l'association entre les facteurs <i>trans</i> et les éléments <i>cis</i>	47
Figure 4. –	Principales étapes de localisation des ARNm	50
Figure 5. –	Modèle conceptuel démontrant les mécanismes de la localisation des ARNm	53
Figure 6. –	Illustration schématique des granules et particules de transport	60
Figure 7. –	Interaction dynamique entre les granules de stress et les p-bodies	62
Figure 8. –	L'implication des vésicules extracellulaires dans la localisation des ARN	63
Figure 9. –	Schéma récapitulatif des mécanismes responsables de l'homéostasie des ARN ..	68
Figure 10. –	Les étapes de la traduction chez les eucaryotes.....	71
Figure 11. –	Voies de dégradation des ARNm	74
Figure 12. –	Représentation schéma du cycle cellulaire de mammifères	76
Figure 13. –	Les étapes de la mitose	79
Figure 14. –	Composants de l'appareil mitotique et dynamique des microtubules	84
Figure 15. –	Interaction fonctionnelle entre RBP et ARN.....	89
Figure 16. –	Types d'ARN cibles des RBP	90
Figure 17. –	Exemples de motifs de reconnaissances de l'ARN par les RBP	93
Figure 18. –	Isoformes de STAU1 et STAU2 humain.....	99
Figure 19. –	dsRBD3-4 de STAU1 en complexe avec un ARNm double brin	104
Figure 20. –	Illustration des sites de liaison des ARN reconnus par STAU1	106
Figure 21. –	Modèle de liaison de STAU1 à l'ARNm et son action	113

Figure 22. –	Modèle pour le mécanisme SMD	115
Figure 23. –	Modèle de régulation du cycle cellulaire par STAU1 et E2F1	117
Figure 24. –	Schéma résume le rôle du SMD dans la progression tumorale	119

Résultats

Article 1 - Characterization of STAU1 CRISPR-knockout in the colorectal cancer cell line HCT116

Figure - 1. Knockout of STAU1 in the colorectal HCT116 cancer cell line by the CRISPR/Cas9 complex system	139
Figure - 2. Biallelic mutations in STAU1-KO clone (CR1.3)	141
Figure - 3. Phenotype analysis of STAU1-KO CR1.3 cell line	142
Figure - 4. Quality control of isolated RNAs	143
Figure - 5. Whole-genome differential expression genes (DEGs) profiling in STAU1-KO CR1.3 versus WT cells	145

Article 2 - Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle

Figure 1 - Localization of STAU1 on the mitotic spindle.....	195
Figure 2 - Co-purification of STAU1 with mitotic spindle proteins.....	197
Figure 3 - Mapping of the molecular determinant involved in STAU1-spindle association	199
Figure 4 - Fine mapping of the N-terminal determinant responsible for STAU1-spindle association	201
Figure 5 - Spindle-enriched transcriptome in HCT116 cells	203
Figure 6 - Validation of RNA-Seq data by RT-qPCR	205
Figure 7 - Co-localization of STAU1 and the translation machinery on spindles	207

Figures supplémentaires

Figure S1 - Co-localization of STAU1 and α -tubulin on mitotic spindle in the non-transformed hTERT-RPE1 cells	211
Figure S2 - Control of antibody specificity	212
Figure S3 - Validation of spindle preparations by microscopy	214
Figure S4 - Knockout of STAU1 in the colorectal HCT116 cancer cell line by the CRISPR/Cas9 complex system	217
Figure S5 - Characterization of exogenously expressed STAU1 ⁵⁵	219
Figure S6 - STAU1 association with spindle is resistant to RNase treatment	221
Figure S7 - Quality controls of RNA-Seq data	222
Figure S8 - Validation of the reproducibility of RNA-Seq data	223

Discussion

Figure 1 - Localisation de STAU1 aux centrosomes	228
Figure 2 - Présence de STAU1 dans les fractions de polyribosomes.....	232

Liste des sigles et abréviations

°C	Degré Celsius
µm	micrometre
µM	Micromolaire
18S	La sous-unité ribosomale 18S
28S	28S ribosomal RNA
3'	L'extrémité 3' du groupement hydroxyle (3'OH) sur C 3' du sucre
3'UTR	Three prime Untranslated Transcribed Region
40S	La sous-unité ribosomale 40S
5'	Côté 5' (5'P) de la séquence polynucléotidique
A	Adénine
aa	Acides aminés
Abs	Absorption
ADN	Désoxyribonucléotides
AMN	Amnion Associated Transmembrane Protein
ANKHD1	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
ARHGEF18	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor18
ARN polyII	l'ARN polymérase II
ARN	ribonucléotides
As	Asynchrone
ASH1	Transcriptional regulatory protein ASH1
AU	Arbitrary Unit
BCA	Bicinchoninic acid
Bcd	bicoid
Brat	Brain tumor
C	Cytosine
CamKIIα	Calciudcalmodulin-dependent protein kinase II α subunit
Cas9	CRISPR-associated protein 9
Cdc20	Spindle Assembly Checkpoint Protein Cdc20

Cdh1	Cadherin 1
Cdk1	Cyclin-dependent kinase1
CDR2L	Cerebellar degeneration-related protein2-like
CFA	Colony formation assays
CHO	Chinese hamster ovary cells
CIC-1	Chloride Channel
Corr	Correlation
CPEB	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CPM	Counts per million
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specific Factor
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CstF	Cleavage Stimulation Factor
C-term	C-terminal
Ctrl	Control
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
DAPI	4',6-Diamidino-2-phénylindole
Dcp2	Decapping complex protein 2
DEGs	Differentially Expressed Genes
DES	DownStream Element
Dim	Dimension
DM1	Dystrophie myotonique de type 1
DMPK	Dystrophia Myotonica protein kinase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Une désoxyribonucléase
dsRBD	double-stranded RNA Binding Domain
dStau	Staufen de la drosophile
DTT	Dithiothreitol
E2F1	E2 promoter binding factor 1
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGFL7	Epidermal growth factor-like domain 7
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid
eIF4E	Eukaryotic Initiation Factor 4E

EJC	Exon-Jonction Complex
eRF1	Eukaryotic translation termination factor 1
EV	Empty Vector
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fold Change
FG-Nucléoporine	phénylalanine-glycine Nucléoporine
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FMRP	Fragil X mental Retardation Protein
FPKM	Fragments Per Kilobase Million
FU	Fluorescence Units
G	Guanine
G1	Gap 1 phase, la première phase du cycle cellulaire
G2/M	Transition entre la phase G2 du cycle cellulaire et la Mitose
G2	Gap 2 phase, la troisième phase du cycle cellulaire, entre la S et M
GAIP	G alpha Interacting Protein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GEC	Glioma-associated endothelial cells
GMC	Cellule Mère Ganglionnaire
gRNA	Guide-RNA
HA	HA-Tag, Human influenza hemagglutinin
HCE	Human Capping Enzyme
HCl	Chlorure d'Hydrogène
HCT116	Human colorectal cancer cell line
HEK 293	Human embryonic kidney 293 cells
hnRNP	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
hTERT-RPE1	hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell line
hTR	Human telomerase RNA
In	Input
IR	Insulin Receptor
kDa	Kilodalton
KIF5	Kinesin superfamily protein 5

KO	Knockout
lncRNAs	Long non-coding RNAs
Log2	Logarithme binaire
log2FC	Log2 Fold Change
LRR	Leucine Rich Repeat domain
LTP	Long-Term Potentiatioend
M	Mitose
Map2	Microtubule-Associated Protein 2
MDS	Multi-Dimensional Scaling plot
MEX3D	Mex-3RNA-binding family member D
MgCl2	Magnesium chloride
MgSO4	Magnesium sulfate
Min	Minute
miRNA	MicroRNA
miscRNA	miscellaneous RNA
mM	Millimolar
MPM-2	Mitotic protein2
mRNA	Messenger RNA
mRNP	Messenger Ribonucleoprotein
MS	Mitotic Spindle
MS-RNA	Mitotic spindle
mStau1	Mouse Staufen1
NaCl	Sodium Chloride
ncRNA	non-coding RNA
Neg	Negative
NLS	Nuclear localization Signal
nM	Nanometre
nm	nanometre
nM	nanomolar
NMD	Non-sens Mediated Decay
NP-40	Nonidet P-40
NPC	Nuclear Pore Complexes
NSCs	Cellules Souches Neurales

nt	Nucleotide
N-term	N-terminal
Nups	Nucléoporines
NXF1	Nuclear RNA export factor1
OD	Optical Density
Osk	oskar
PABP2	Poly(A) Binding Protein II
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PAP	poly(A) polymérase
P-bodies	Processing bodies
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase chain-reaction
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium Iodide
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
Poly(A)	Polyadénylation
PRM	RNA recognition motif
Pros	Prospero
Protéine SR	Serine/arginine-Rich
PSD	Postsynaptic Density
p-value	Probability value
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
qRT-PCR	Real-Time quantitative PCR
RAD23B	RAD23 homolog B
RBD	RNA Binding Domain
RBP	RNA-binding protein
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RIN	RNA Integrity Number
RNA	RiboNucleic Acid
RNase	Une ribonuclease
RNase	Enzyme qui catalyse l'hydrolyse des acides ribonucléiques
RNA-Seq	RNA transcriptome sequencing

RNP	Ribonucléoprotéique
RO-3306	5-(6-Quinolinylnmet)-2-[(2-thienylmethyl) amino]-4(5H)-thiazolone
ROBO4	Roundabout4
RT	Room Temperature
RT-PCR	Real-time Reversed Transcriptase Polymerase chain-reaction
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain-Reaction
s	seconde
S	Phase de synthèse du cycle cellulaire
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SBS	Staufen-binding site
SD	Standard Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SG	Stress Granules
sgRNA	short guide RNA
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SMD	Staufen-mediated decay
SMG	Suppressor with Morphological effect on Genitalia
SNHG5	Small Nucleolar RNA Host Gene 5
snRNP	Small nuclear ribonucleoproteins
SSM	Staufen-Swapping Motifs
STAU1	Staufen1
STAU1 ⁵⁵	Staufen1 55 kDa
STAU1 ⁶³	Staufen1 63 kDa
STAU2	Staufen2
STAU2 ⁵²	Staufen2 52 kDa
STAU2 ⁵⁶	Staufen2 56 kDa
STAU2 ⁵⁹	Staufen2 59 kDa
STAU2 ⁶²	Staufen2 62 kDa
T	Thymine
TAR	Élément de réponse transactivateur
Taxol	Paclitaxel

TPM	Transcripts Per Kilobase Million
TREX-2	Three Prime Repair Exonuclease 2
Tris	Trisaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
UCSC	University of California Santa Cruz genome browser
UG	Uracile Guanine
UPF	Up-frameshift suppressor homolog
V/V	Volume/Volume
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VS	Versus
W/V	Weight/Volume
WB	Western Blot
WT	Wild Type
XStau1	Xenopus Staufen
ZBP1	Zipcode binding protein 1
ZNF655	Zinc finger protein 655
α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta

*Je dédie cette thèse à ma famille, ma femme et mes enfants
pour leurs précieux encouragements et la place
qu'ils occupent dans mon cœur*

Remerciements

Tout d'abord, il m'importe de souligner l'appui indéfectible du principal instigateur de cette réussite, mon directeur de recherche, le professeur Luc DesGroseillers. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de votre équipe. Merci également pour votre ouverture d'esprit, votre bonne humeur quotidienne et votre approche de psychologie positive.

Merci à tous mes collègues d'avoir rendu le travail de laboratoire aussi divertissant. Mehdi Ghram, merci pour ton soutien et pour ta belle amitié. Je te souhaite du succès et beaucoup de plaisir dans la poursuite de ta carrière. Lionel Condé, tu as de belles motivations à faire de la recherche et atteindre tes objectifs (l'OMS). Yulemi Gonzalez Quesada, tu as le souci du travail bien fait et c'est une qualité appréciée en recherche. Merci à tous les autres membres du laboratoire que j'ai moins eu la chance de connaître, mais qui ont contribué à mon projet, Florence Bonnet-Magnaval et Bellastrid Doran.

Je remercie les membres de mes comités de thèse et du prédoc, Dr Pascal Chartrand, Dr Éric Lécuyer, Dr Luis Rokeach et Dr Jean-Claude Labbé. Avec ténacité, vous m'avez amené à me remettre en question et à poursuivre ma croissance. Je vous en suis reconnaissant.

Je tiens à remercier également Dr Gerardo Ferbeyre, Dr Pascal Chartrand, Dr Benoît Chabot et Dre Petronela Ancuta d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à rendre hommage aux membres de laboratoires voisins : labo Ferbeyre, labo Chartrand, labo Michnick, labo Roy, labo Zenklusen, labo Baron et labo Franz Lang. Merci de partager l'équipement et de dépanner sans hésitation.

Merci à la faculté de médecine de m'avoir donné l'opportunité de participer dans la formation de leurs étudiants en tant qu'auxiliaire d'enseignement. Vous m'avez permis de combler une passion et d'avoir une expérience complète et enrichissante au cours de mon doctorat. Merci à Marie Pageau, Monique Vasseur, Philip Lampron et Audrey Noël au département de biochimie et de médecine moléculaire. Merci à Louise Cournoyer pour son assistance technique essentielle en culture cellulaire. Linda D'Astous, Lorraine Bidegare-Charette, Kathie Gierka, Élane Meunier, Pascale Phan et l'inoubliable Sylvie Beauchemin, merci pour votre travail impeccable. Merci, Ginette Desjardins, Ernest et Robert, pour votre précieux travail.

Merci à la faculté de pharmacie de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner et de transmettre quelque chose directement aux étudiants. Merci, Dr Stéphane Maltais, pour ta confiance et toutes les opportunités que tu m'as offertes. J'ai apprécié travailler avec toi autant lors des démonstrations que lors de la correction des rapports.

Merci à tous les personnels de la bibliothèque de la santé pour leurs soutiens inestimables. Frédéric Séguin, Jean-François Lizé et Nancy Primeau, votre travail est tellement apprécié.

Merci à tous les techniciens du service informatique pour leurs soutiens inestimables. Wassif Cheikh, merci pour ta disponibilité, le plaisir que tu prends à m'épauler et pour tout ce que tu m'as appris en informatique.

Je tiens à remercier également la Mission universitaire de Tunisie en Amérique du Nord (MUTAN) qui m'a permis de continuer mes études magistrales en épargnant les frais de scolarité majorés. Je remercie également la faculté de médecine de et la faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal pour les bourses qu'elles m'ont octroyées.

Je dédie cette thèse à tous mes enseignants et enseignantes de l'école primaire de Bazma, notamment madame Wassila Jridi et madame Moufida Benkhalifa, deux enseignantes exceptionnelles.

Cette thèse est également dédiée à l'intention de mes professeurs du lycée secondaire Khairedine Janoura, spécialement monsieur Ahmed Thabet, monsieur Belgacem Mokadem, monsieur Nabil Farjallah, monsieur Mohamed Belhaj Amor, monsieur Zaher Mabrouk, monsieur Moncer Bensalah, madame Lamia Mouhamed-Ali, monsieur Abdelmajid Benzayed, ainsi qu'à tous les autres enseignantes et enseignants du lycée. Je tiens également à rendre hommage à tous les personnels de direction et les employés de l'établissement pour leurs soutiens inestimables.

Je dédie cette thèse à tous mes professeurs à la faculté des sciences de Gabès, particulièrement Dr Slaheddine Selmi, Dr Mohamed Chaieb, Dr Mohamed Mars et Dr Habib Khmira.

Je tiens à remercier également mes chers amis : Dr Moncef Benkhalifa (Amiens, France), Dr Abdellali Kelil (University of Toronto, Canada) et Dr Jemni Ben Chibani (ISBM Monastir, Tunisie) pour leur encouragement et leur soutien.

Cette thèse de doctorat est dédiée exceptionnellement à l'artiste Ahmed Saadaoui (Hmed Hachoud), vous êtes parmi les fondateurs de cette réussite. Votre volonté à faire la différence et votre engagement culturel et artistique auprès des jeunes écoliers de ma génération fut pour moi un exemple de persévérance qui m'a encouragé à ne jamais abandonner, quelle que soit l'ampleur des défis à révéler. Vous avez été le premier à avoir cru en nous et à avoir décelé nos potentiels. Vous avez fait naître en moi une grande confiance et vous avez ouvert mon esprit et mon horizon et je vous en serai toujours reconnaissant.

Aux amis, merci pour l'enrichissement de nos partages et nos échanges.

À ma mère et à l'âme de mon père, merci beaucoup pour votre amour et votre soutien continuel. Vous m'avez appris tellement de choses qui ne s'apprennent pas à l'école.

À vous mes chers frères et sœurs, neveux et nièces, beaux-frères et belles-sœurs, merci pour votre appui constant et votre encouragement. Mes enfants sont très fiers d'avoir une grande famille.

À ma belle-famille, merci de m'avoir considéré des vôtres. Vous êtes une excellente famille serrée. Kawthar, tu as transmis de superbes valeurs à tes enfants. Je dédie cette thèse de doctorat à ton âme qui se repose en paix.

À mes merveilleux enfants : Mayar et Ahmed, vous m'avez donné la force de poursuivre mon chemin sans jamais abandonner. Vous êtes les racines de mes pensées, le souffle qui me permet d'avancer chaque jour. Mes chéris, merci pour tout le bonheur que vous m'avez donné, je vous aime tellement.

À la meilleure des femmes, je te remercie du plus profond de mon cœur pour ta fidèle présence, ton réconfort et ton soutien inconditionnel. Wiem, sans toi il m'aurait été difficile de parvenir au bout du chemin. Merci d'être dans ma vie, merci d'être la maman de mes enfants, je serai toujours là pour vous.

Je voudrais remercier tous ceux et celles que j'ai rencontrés dans cette vie qui m'a fait vivre toutes sortes d'expériences.

Valorisation des travaux

Les travaux exposés dans cette thèse et ceux auxquels j'ai contribué pendant la période de recherche doctorale ont fait l'objet des publications suivantes :

Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle

Sami Hassine, Florence Bonnet-Magnaval, Louis-Philip Benoit-Bouvrette, Bellastrid Doran, Mehdi Ghram, Mathieu Bouthillette, Eric Lecuyer, and Luc DesGroseillers

Journal of Cell Science (2020) 133, jcs247155

Programmable, self-regulated molecular carrier for precise, sustained drug delivery

Arnaud Desrosiers, R.M. Derbali, **Sami Hassine**, J. Berdugo, V. Long, D. Lauzon¹, V. De Guire, C. Fiset, Luc DesGroseillers, J. Leblond Chain, Alexis Vallée-Bélisle.

Article soumis dans le journal Science Advances

HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles

Shringar Rao, **Sami Hassine**, Anne Monette, Raquel Amorim, Luc DesGroseillers and Andrew J. Mouland

RNA 25:727–736 (2019)

The M-phase specific hyperphosphorylation of Staufen2 involved the cyclin-dependent kinase CDK1

Rémy Beaujois, Elizabeth Ottoni, Xin Zhang, Christina Gagnon, **Sami Hassine**, Stéphanie Mollet, Wildriss Viranaicken, Luc DesGroseillers

BMC Cell Biology volume 19, Article number: 20 (2018)

Characterization of STAU1 CRISPR-knockout in the colorectal cancer cell line HCT116

Sami Hassine, Louis-Philip Benoit-Bouvrette, Florence Bonnet-Magnaval, Mehdi Ghram¹, Eric Lecuyer, and Luc DesGroseillers

Article en préparation

J'ai également présenté des communications orales et/ou par affiche dans des congrès, colloques et symposiums.

1 Introduction

Chez les organismes pluricellulaires, la finalité biologique majeure de l'individu est d'acquies, puis de maintenir, sa forme et ses performances. Cet organisme est le produit d'une cascade de divisions successives de l'œuf fécondé. Une série de divisions stéréotypées ne saurait produire qu'un nombre de structures très limité si elles avaient lieu selon un processus identique pour toutes les cellules issues du zygote. L'immense diversité des formes et des structures du vivant est rendue possible grâce à un phénomène de modulation de l'expression génique durant les différentes phases du cycle cellulaire. Chez les mammifères, ce mécanisme est fondamental pour la croissance et le développement. Par ailleurs, l'objectif primordial de la division cellulaire est la duplication puis la distribution fidèle de l'information génétique entre la cellule mère et les cellules filles au cours de la mitose. Grâce à ce processus, le patrimoine génétique est conservé, cependant, les gènes, eux, peuvent avoir une expression différenciée dans le temps et dans l'espace. Cette régulation dynamique de l'expression génique permet aux organismes vivants de s'adapter aux contraintes environnementales et de maintenir une homéostasie cellulaire. L'information qui dicte le maintien de cette homéostasie se trouve encodée dans le génome. Par conséquent, le dysfonctionnement de ce mécanisme est susceptible de perturber l'équilibre en place et abouti à l'apparition des maladies, tels que le développement d'un cancer (1).

Il est établi que l'information génétique est conservée dans la cellule sous trois formes fonctionnellement reliées: ADN, ARN et protéines. Le dogme central de la biologie moléculaire suppose que l'ARNm est obtenu par la transcription de l'ADN génomique, un phénomène bidirectionnel. Cependant, la synthèse protéique est basée sur un phénomène unidirectionnel, soit la traduction de l'ARNm. La transition de l'information génétique entre les différentes formes est

hautement contrôlée afin de restreindre l'accumulation des mutations requise pour un comportement invasif (2).

Ainsi, trois mécanismes de contrôle de l'expression génique peuvent être envisagés par la cellule pour éviter les aberrations aléatoires : la régulation transcriptionnelle, la régulation post-transcriptionnelle et la régulation post-traductionnelle. Ces mécanismes permettent aux cellules de conserver l'intégrité de son patrimoine génétique, voire induire un arrêt transitoire de la prolifération afin d'avoir le temps nécessaire pour la réparation des dommages subis (3, 4). Cependant, si l'état standard des cellules est compromis à la suite d'une lésion majeure, des mécanismes visant à bloquer de façon permanente la division cellulaire sont engagés. Il s'agit soit de la sénescence cellulaire ou de l'apoptose, et ce, pour éviter la propagation de cellules mutantes, par exemple à la suite de l'activation d'un oncogène (3, 5).

Étant donné l'importance de la régulation post-transcriptionnelle au sein des travaux présentés dans cette thèse, nous y apporterons une attention plus particulière dans les sections qui suivent.

Ainsi, ce mécanisme est contrôlé par plusieurs facteurs associés aux transcrits. La majorité de ces effecteurs appartiennent à la famille de protéines ayant la capacité de lier les ARN ou RBP « *RNA-Binding Proteins* ». Les RBP interagissent avec les ARN sous forme d'un complexe ribonucléoprotéique ou RNP. Parmi les 1500 RBP exprimées par la cellule humaine, nous nous sommes intéressés dans cette thèse à l'étude du rôle de Staufen1 (STAU1) dans la régulation post-transcriptionnelle des ARN spécifiques lors de la mitose chez les cellules de cancer colorectal humain HCT116.

1.1 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique

La régulation de l'expression génique implique plusieurs processus cellulaires distincts, y compris la transcription et la traduction. Contrairement aux procaryotes, la transcription et la traduction chez les eucaryotes sont deux processus physiquement séparés par la membrane nucléaire. Afin de limiter l'expression de chaque produit protéique au moment et à l'endroit où son effet est requis, l'ARNm se doit d'être régulé avec précision au niveau de sa maturation, de son export nucléaire, de sa localisation subcellulaire, de sa répression, de sa traduction ainsi que de sa dégradation. Ces événements représentent les multiples facettes de la régulation post-transcriptionnelle, un mécanisme émerge progressivement grâce à la perpétuelle innovation technologique des microscopes automatique et de séquençage à haut débit (6).

1.1.1 Cycle de vie de l'ARNm

1.1.1.1 Maturation

La maturation des pré-ARNm est un processus qui survient de façon co-transcriptionnelle. Les facteurs intervenants dans la régulation de maturation interagissent avec l'ARN-naissant sous forme d'un complexe hnRNP « *heterogenous nuclear ribonucleoprotein particle* » (7). Le transcrit primaire, produit initial de la transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol II), subira plusieurs modifications avant d'être exporté du noyau vers le cytoplasme. La maturation de pré-ARNm consiste à l'ajout d'une coiffe en 5', l'épissage des introns et l'ajout d'une séquence poly-A en 3' (Figure 1) (8). Ces événements sont interconnectés et influencent le destin subséquent de l'ARNm dans le cytoplasme. Chaque étape permet de recruter des facteurs nécessaires à l'export et à la localisation subcellulaire du transcrit. Une défaillance dans l'une de ces modifications nucléaires

mène à la séquestration nucléaire des ARN, un phénomène observé dans plusieurs maladies. Dans la majorité des cas, les ARN piégés dans le noyau vont être dégradés par l'exosome (9).

1.1.1.1.1 Ajout de la coiffe

Cette étape se produit après que 20 à 30 nucléotides ont été synthétisés. Elle correspond à l'ajout d'une guanosine sur l'extrémité 5' du brin d'ARN suivi d'une méthylation sur son azote 7 de la base, ainsi qu'une méthylation en position 2' du ribose du premier nucléotide. Ce processus est régulé par deux enzymes: la méthylotransférase et le HCE « *Human Capping Enzyme* » (10). La coiffe est nécessaire pour la protection de l'ARNm contre la dégradation par les exonucléases. De plus, elle est impliquée dans le recrutement du facteur d'initiation de la traduction eIF4E « *Eukaryotic Initiation Factor 4E* » ainsi que dans l'export nucléaire des ARNm (8, 11).

1.1.1.1.2 Épissage

Chez les mammifères, les gènes codant pour des protéines sont constitués d'une alternance des séquences codantes (exons) et des séquences non codantes (introns). Lors de la transcription, les gènes sont intégralement copiés par l'ARN polymérase II. L'épissage du pré-ARNm consiste à exciser les introns et liguer les exons afin de garder l'information nécessaire à la production de protéines fonctionnelles (12). Ce processus est assuré par le spliceosome, soit un complexe protéique formé de cinq snRNP « *small nuclear ribonucleoproteins* » (12, 13). L'assemblage des spliceosomes est régulé par des RNP tel que les protéines hnRNP et les protéines SR « *serine/arginine-rich* » (14). Cette machinerie est requise pour assurer l'interaction entre l'extrémité 3' d'un exon et l'extrémité 5' d'un autre exon pour former un ARNm. La jonction exon-exon est marquée par le complexe EJC « *Exon junction complex* » composé de protéines UPF2 et

UPF3 « *up-frameshift suppressor homolog* » qui accompagnent l'ARNm jusqu'à son premier cycle de traduction (13, 15). Ce remaniement se déroule au fur et à mesure que la progression de la chaîne de synthèse transcriptionnelle. À partir d'un seul pré-ARNm peuvent être générés plusieurs ARNm matures différents codant pour plusieurs isoformes de la protéine correspondante, et ce, grâce à un processus d'épissage alternatif dépendant de la présence d'une structure secondaire et par la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II (16). L'efficacité de l'épissage alternatif est inversement proportionnelle à la vitesse de l'ARN polymérase II (17). Des erreurs dans l'épissage peuvent entraîner des déséquilibres moléculaires et cellulaires et peuvent causer des maladies (18).

1.1.1.1.3 Clivage et polyadénylation

La dernière modification subite par le pré-ARNm avant sa translocation nucléaire se déroule en deux étapes : le clivage de l'ARN naissant et l'addition d'une extension poly-A (200 à 250 résidus) à l'extrémité 3' par le poly-A-polymérase (PAP). En amont du site de polyadénylation se trouvent une séquence de reconnaissance conservée (AAUAAA) et en aval une séquence riche en UG, DSE « *DownStream Element* ». La séquence DSE est reconnue par le complexe protéique CstF « *Cleavage Stimulation Factor* » alors que la séquence consensus AAUAAA recrute le facteur CPSF « *Cleavage and Polyadenylation Specific Factor* ». L'association de ces deux complexes avec l'ARN poly II, le PAP et d'autres facteurs forme le complexe de clivage responsable du détachement du pré-ARN au niveau de l'extrémité 3' (19). La séquence poly-A est stimulée par la protéine PABP2 « *Poly(A) Binding Protein II* » qui interagit avec la protéine PAP (20). L'extension poly-A est impliquée dans la protection des messagers contre la dégradation, dans l'export nucléaire des ARNm et dans le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S médié par le facteur d'initiation à la traduction eIF4E (7, 8, 11, 19). À l'exception des ARNm codant pour

les histones, tous les ARNm de la cellule eucaryote possèdent une queue poly-A à leur extrémité 3'. Le raccourcissement de cette séquence (inférieur à 30 A) entraîne la reconnaissance de l'ARNm par l'exonucléase et induit sa dégradation (21).

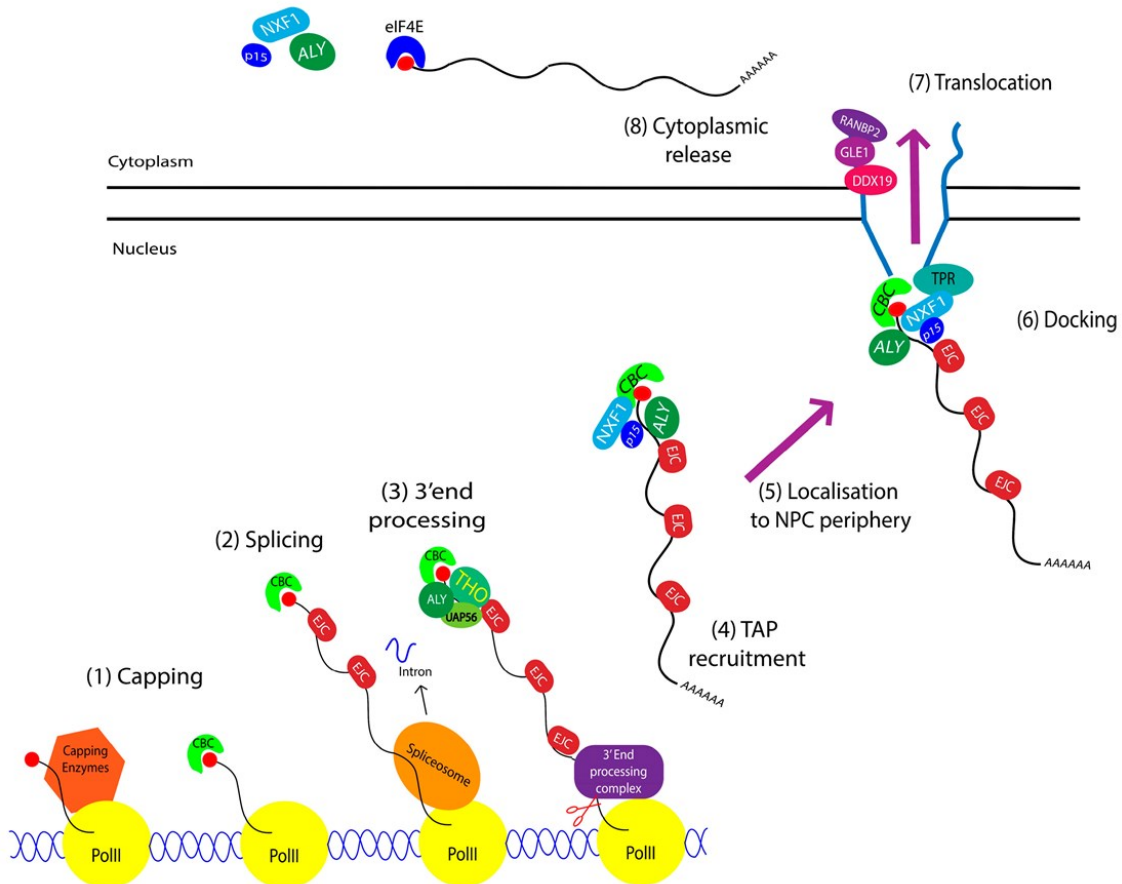


Figure 1. – Aperçu global de la maturation et de l'export nucléaire des ARNm

Ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine à l'extrémité 5' (1); épissage (2); clivage et polyadénylation en 3' (3); export nucléaire (4-7); relargage des mRNP dans le cytoplasme (8). Figure tirée de (22).

1.1.1.2 Export nucléaire

C'est le passage de l'ARNm mature de son site de transcription au noyau vers le cytoplasme via l'enveloppe nucléaire. Cette translocation est contrôlée par les événements survenus au cours de maturation. En effet, l'export nucléaire et la localisation cytoplasmique sont dictés par les facteurs nucléaires recrutés pendant la phase de maturation du pré-ARNm (23). La translocation nucléocytoplasmique des ARNm dans des mRNP (Ribonucléoprotéines) se fait typiquement via le complexe de pores nucléaires ou NPC « *Nuclear Pore Complexes* ». Le NPC est composé d'environ trente protéines appelées nucléoporines (Nups) et d'une séquence répétitive de phénylalanine-glycine ou FG-nucléoporine. Les Nups sont impliqués dans l'ancrage des NPC à l'enveloppe nucléaire (24). Les répétitions FG tapissent la voie empruntée par les transporteurs pour acheminer leur chargement à travers les canaux centraux des NPC (25, 26). Les molécules de poids moléculaire inférieur à 40 kDa traversent les pores par simple diffusion (27). Cependant, le passage des macromolécules nécessite l'intervention des facteurs protéiques de transport actif (28). Chez les mammifères, la vaste majorité des messagers sont exportés grâce à un hétérodimère composé des protéines NXF1/TAP et p15 (Figure 1). Ces récepteurs interagissent directement avec les NPC (29, 30). Certains types d'ARN, tels les ARNs ribosomiques, sont exportés via la voie CRM1 « *Chromosome Region Maintenance 1* » (31).

Le transfert des mRNP depuis le site de transcription jusqu'au NPC est assuré par la protéine d'échafaudage TREX-2 « *Three Prime Repair Exonuclease 2* » formé entre autres par des protéines UAP56 et ALY (9, 24, 32, 33). TAP/p15 est alors recruté par ALY et achemine le mRNP vers les pores nucléaires. Après avoir traversé les canaux des NPC, les mRNPs seront relâchés dans le cytoplasme pour recruter d'autres facteurs, eIF4E par exemple, et entamer un autre niveau de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (24).

1.1.1.3 Localisation des ARNm

La notion de localisation des ARNm a été émergée par l'observation d'une distribution subcellulaire asymétrique des transcrits dans les embryons précoces des ascidies, dans les fibroblastes embryonnaires de poulet et dans les ovocytes des drosophiles (34, 35). Avant cette découverte, les canons de la biologie moléculaire se reposaient sur l'idée que la régulation de l'expression génique est basée sur la transcription et les modifications post-traductionnelles. Or, la nouvelle notion suggère que l'ARNm qui code pour ces protéines pourrait lui-même faire l'objet d'une régulation spatiotemporelle de son expression via, entre autres, une localisation subcellulaire spécifique (36). En effet, la localisation de l'ARN est un paradigme conservé depuis les bactéries (37). D'ailleurs, des analyses d'hybridation in situ à fluorescence FISH « *fluorescent in situ hybridization* » mené à grande échelle sur les embryons de la drosophile montrent que 71 % des ARNm se localisent dans des profils fortement corrélés avec la distribution subcellulaire de leurs protéines encodées (38, 39).

1.1.1.3.1 Avantages

La localisation des ARNm comporte plusieurs avantages pour la cellule. Tout d'abord, à partir de la livraison d'une seule molécule d'ARNm on peut obtenir la synthèse des centaines de copies de sa protéine, ce qui permet une diminution du trafic global des macromolécules et une importante économie énergétique pour la cellule que si elle devait transporter individuellement chaque protéine (38, 40, 41). Au-delà du gain énergétique, la localisation spécifique des ARNm réprimés permet de restreindre l'expression inutile d'un produit potentiellement toxique pour l'organisation et la viabilité cellulaire (40). De plus, elle favorise un enrichissement rapide de la protéine directement à l'endroit où son action est requise afin de permettre une réaction cellulaire

rapide en réponse à un stimulus, tel que la réparation d'un dommage à l'ADN (42). D'autre part, il a été montré que les ARNm codants pour des protéines agissant dans un même complexe possèdent souvent des profils de distribution subcellulaire semblable, on peut supposer donc que la localisation des ARNm facilite l'assemblage des facteurs impliqués dans le même régulon (43-45). En effet, la localisation des ARN non codants, qui agissent comme des molécules d'échafaudage, est impliquée dans la formation des complexes macromoléculaires primordiaux pour la cellule (46, 47). Enfin, le processus de localisation des ARNm est impliqué dans l'entreposage des transcrits dans des inclusions cytoplasmiques comme les P-bodies « *Processing bodies* » et les granules de stress SG « *Stress Granules* » (48).

1.1.1.3.2 Processus impliquant la localisation des ARNm

Bien que l'objectif ultime de l'expression génique soit la production des protéines, les transcrits ne sont pas nécessairement pris en charge par la machinerie de la synthèse protéique dès la transcription. Pour certains types cellulaires, l'action d'un produit protéique est requise à un endroit distal par rapport à son site de transcription. Dans les cellules neuronales par exemple, l'ARNm transcrit au noyau doit être transporté jusqu'à la synapse où il sera traduit en une protéine requise pour une action synaptique.

Ainsi, la localisation d'ARNm est impliquée dans divers processus biologiques essentiels, tels que la division cellulaire, le développement embryonnaire, la migration cellulaire, la plasticité synaptique ainsi que la prolifération cellulaire. Ce phénomène est observé chez la plupart des organismes modèles étudiés : levure, plantes, ascidie, drosophile, poisson-zèbre, xénope et mammifères (49, 50).

1.1.1.3.2.1 Division cellulaire asymétrique

Une division cellulaire est considérée asymétrique lorsque les deux cellules filles n'héritent pas le même contenu cytoplasmique et par conséquent adoptent de ce fait un destin différent. La ségrégation différentielle des ARNm durant la mitose est impliquée dans la polarisation cellulaire. Au cours de la division de *S. cerevisiae*, plus que 30 ARNm sont transportés jusqu'à l'extrémité distale de la cellule fille. Parmi ces transcrits on trouve l'ARNm *ASH1*. Ash1 est un régulateur transcriptionnel capable de réprimer l'expression de la protéine HO qui est responsable de la commutation de l'identité sexuelle chez les levures. La localisation de l'ARNm *ASH1* au bourgeon de la cellule fille en anaphase impose un type sexuel différent de celui de la cellule-mère (Figure 2e) (51-53).

Chez la drosophile, la division de la cellule souche neurale (NSC) « *Neural stem cells* » ou neuroblaste, génère deux cellules filles de taille différente : une grande cellule apicale qui garde l'identité qualifiée cellule souche et une petite cellule basale appelée cellule mère ganglionnaire GMC « *Ganglion Mother Cell* ». Au cours du développement embryonnaire, les GMC se différencient en neurones et cellules gliales (54, 55). Cette différenciation est facilitée par le fait que des ARNm codants pour des facteurs déterminants sont localisés au pôle basal des GMC, tels que *Prospero (Pros)*, *Brain tumor (Brat)*, *Numb* et *Miranda*. L'altération de la ségrégation asymétrique de ces ARNm aboutit à des défauts dans l'établissement de l'identité chez les cellules naissantes ce qui entraîne l'hypotrophie de leur système nerveux (56).

1.1.1.3.2.2 Développement embryonnaire

Chez la drosophile, la localisation asymétrique des ARNm maternels joue un rôle décisif dans l'établissement des axes embryonnaires de l'ovocyte au cours du développement (Figure 2)

(57). Durant l'ovogenèse de la drosophile, des ARNm synthétisés pas les cellules nourricières sont enrichies dans des régions spécifiques de l'ovocyte (58). La localisation asymétrique de certains de ces ARNm, tels *bicoid* (*bcd*), *oskar* (*Osk*), *gurken* (*grk*), et *nanos*, favorise la production locale des protéines impliquées dans la morphogénèse. La localisation des ARNm *bcd* au pôle antérieur et les ARNm *Osk* et *Nanos* au pôle postérieur de l'ovocyte contribue dans l'établissement des plans corporels antéro-postérieur et dorso-ventral de l'embryon (Figure 2a) (38, 59, 60). Enfin, l'ARNm *grk* est subséquentement localisé autour du noyau de l'ovocyte, en position antérodorsale et code pour une protéine primordiale pour l'établissement des axes antéro-postérieur et dorso-ventral lors de l'embryogenèse chez la drosophile (61, 62).

D'ailleurs, le contrôle de la détermination morphogénétique du corps embryonnaire par la localisation des ARNm spécifiques est un processus conservé chez le xénope. En effet, plusieurs transcrits sont localisés au pôle végétatif de l'ovocyte du xénope, tels *Xcat2/Nanos1*, *Xdazl*, *Vg1* et *VegT* (63, 64). Ces gènes sont impliqués dans la spécification des cellules germinales au cours de l'embryogenèse et dans la modulation de l'endoderme et du mésoderme lors du développement embryonnaire (Figure 2b) (46, 65, 66).

1.1.1.3.2.3 Migration cellulaire

Le trafic intracellulaire des ARNm est aussi impliqué dans la motilité cellulaire, un mécanisme de mouvement cellulaire sur une matrice extracellulaire. Ce processus physiologique est impliqué dans la réponse inflammatoire, la cicatrisation et la dissémination tumorale (67).

Ainsi, la localisation et la traduction locale des ARNm *β -actine* et *Arp2/3* au niveau du lamellipode des cellules migratrices est essentiel pour la polymérisation de filaments d'actine impliqués dans la migration cellulaire dirigée (figure 2c) (43, 68, 69). D'ailleurs, il a été montré

que la localisation des ARNm est essentielle pour la croissance dirigée de dendrites en réponse à une stimulation (70). De plus, le transport des ARNm est important aussi pour l'immobilisation des cellules par le renforcement de points d'attachement à la matrice extracellulaire. Selon des études *in vitro* menées sur des cellules endothéliales, une population d'ARNm se trouve enrichie au niveau de sites d'adhérences focales. Ce phénomène favorise la production locale des filaments de cytosquelettes et facilite le déplacement cellulaire (71).

1.1.1.3.2.4 Plasticité synaptique

C'est la capacité d'une synapse à apporter des remodelages morphologiques et moléculaires au niveau des épines dendritiques afin d'optimiser la communication nerveuse en réponse à un stimulus. Ce phénomène est à la base de l'apprentissage et de la mémoire à long terme (72). La localisation des ARNm dans les neurones contribue au ciblage des protéines dans les synapses et favorise la plasticité synaptique comme dans le cas de la sous-unité alpha de la calmoduline kinase II (*CamKII α*) (Figure 2d) (73). Dans les cellules neuronales, les transcrits sont généralement transportés via le réseau des microtubules (74, 75). Certains messagers sont présents d'une manière constitutive dans les dendrites, d'autres seraient transcrits et acheminés rapidement à l'endroit synaptique où sa traduction est requise en réponse à un stress, comme l'ARNm *Arc* (76). La protéine *Arc* est impliquée dans la plasticité synaptique par le maintien de la potentialisation à long terme. Alors que les ARNm activement localisés dans les synapses encodent, souvent, pour des protéines impliquées dans le remodelage de la synapse, telles les protéines membranaires, cytosquelettiques et cytoplasmiques (77).

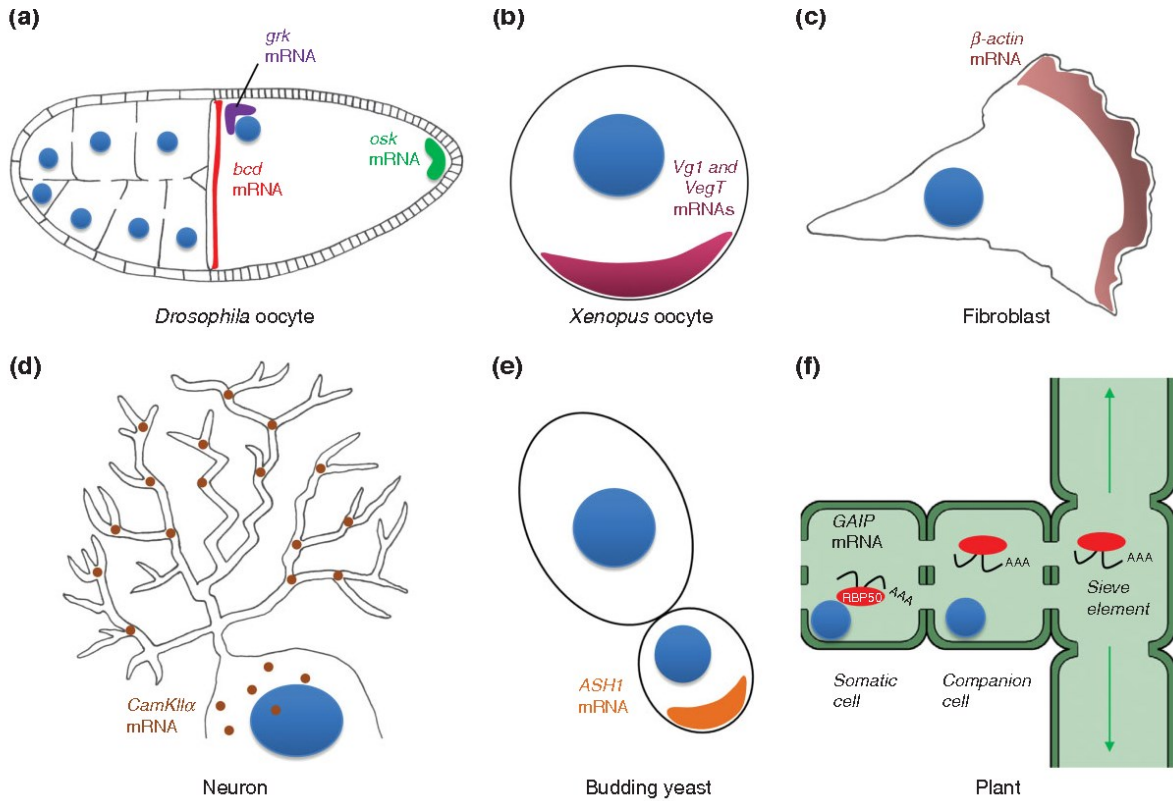


Figure 2. – Localisation des ARNm dans différents organismes

(a) Localisation des ARNm maternels *bicoid* (rouge), *oskar* (vert) et *gurken* (violet) dans l'ovocyte de la drosophile. (b) Chez l'ovocyte de Xénope, les ARNm *Vg1* et *VegT* sont ciblés au pôle végétal pour la formation de l'endoderme et du mésoderme. (c) Localisation l'ARNm de la β -actine dans les lamellipodes des fibroblastes en migration pour faciliter l'assemblage de filaments d'actine. (d) Localisation de l'ARNm *CamKIIa* aux dendrites neuronales. (e) Ségrégation de l'ARNm *Ash1* dans la cellule fille durant la division par bourgeonnement de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le transcrite *Ash1* régule la commutation du type sexuel. (f) Trafic du complexe ribonucléoprotéique formé par la protéine RBP50 et les ARNm *GAIP* dans le phloème de la citrouille *Cucurbita maxima*. Figure tirée de (57).

1.1.1.3.3 Éléments de localisation des ARNm

1.1.1.3.3.1 Éléments *cis* (Zipcodes)

Les déterminants de la localisation des ARNm ont fait l'objet de plusieurs études. Ces efforts ont conduit à l'apparition d'un paradigme général : tous les ARNm localisés possèdent des éléments de localisation en *cis* ou zipcode « *cis-regulatory motifs* ou *cis-acting motifs* » situés généralement vers l'extrémité 3'UTR du transcrit. Ces éléments non-consensus peuvent être constitués de séquences nucléotidiques linéaires et/ou des structures secondaires ou tertiaires (78).

Parmi les zipcodes les plus définis, on peut citer l'élément de localisation de bicoïde BLE « *bicoïde localization Element* » nécessaire à la localisation du messager au pôle antérieur de l'ovocyte de drosophile. Cet élément consiste en une structure tertiaire de tige-boucle située dans la région 3'UTR du transcrit (79, 80).

1.1.1.3.3.2 Facteurs *trans*

Décrits comme des facteurs agissant en *trans* sur les éléments de reconnaissance en *cis* dans les ARNm cibles. L'ensemble forme un complexe ribonucléoprotéique via des interactions protéine-protéine. Ces facteurs de régulation en *trans* accompagnent les ARNm dans toutes les étapes de son métabolisme : maturation, export nucléaire, localisation, traduction et dégradation. Les facteurs *trans* peuvent être des RBP et/ou des ARN non codants incluant les miRNA « *micro RNA* » et les lncRNA « *long non-coding RNA* » (Figure 3) (78, 81).

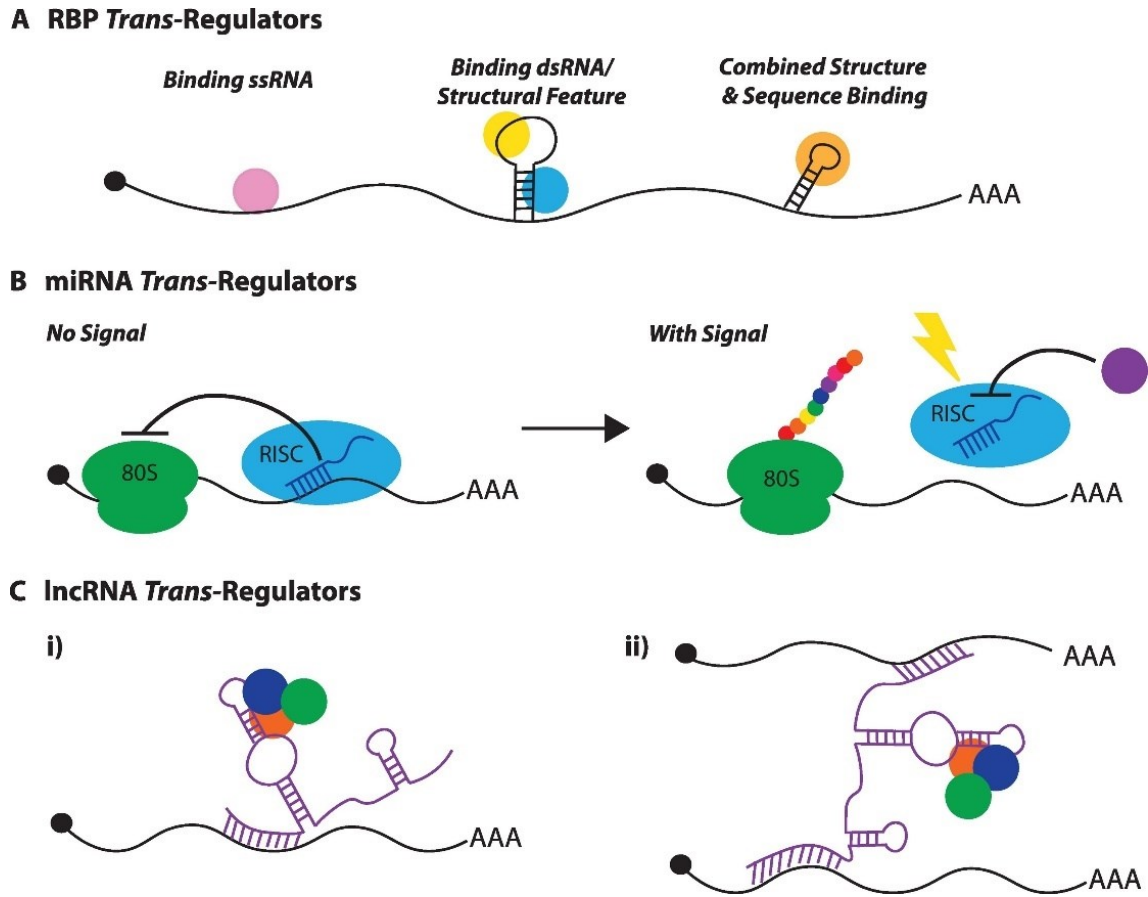


Figure 3. – Schémas de l'association entre les facteurs *trans* et les éléments *cis*

(A) Le RBP, régulateur en *trans*, s'associe à différentes séquences ou structure de l'ARNm. (B) Le facteur *trans* miRNA s'associe à l'ARNm pour réprimer sa traduction, cette association est médiée par RISC. (C) lncRNA, un régulateur en *trans* qui interagit avec l'ARNm cible pour (i) recruter la machinerie du transport ou pour (ii) sert comme un pont d'assemblage protéique. Les protéines sont représentées par des cercles. Figure tirée de (82).

1.1.1.3.4 Mécanismes de localisation des ARNm

Le transfert des ARNm vers une région spécifique d'une cellule ou d'un embryon est obtenu par le moyen de quatre mécanismes : transcription localisée, dégradation et stabilisation (83, 84),

diffusion et ancrage (85) et le mécanisme de transport actif (Figure 5) (65) (83, 86, 87). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la localisation du même ARNm.

1.1.1.3.4.1 Transport actif

Le transport actif désigne le transfert des macromolécules grâce à l'utilisation des moteurs moléculaires via le réseau de cytosquelette. C'est le mécanisme le plus utilisé pour localiser les ARNm dans la plupart des types cellulaires (57). Ce phénomène implique un couplage entre les particules RNP et la machinerie du transport actif. L'acheminement d'un transcrite vers son site d'action s'effectue selon quatre étapes. La première étape est la formation nucléaire des RNP impliqués dans la maturation et l'export des transcrits. La deuxième étape est cytoplasmique et consiste à l'oligomérisation des RNP via des interactions protéine-protéine. L'étape numéro trois c'est l'assemblage des RNP formant des granules de transport d'ARNm. La dernière étape est le transport actif des granules d'ARNm jusqu'à destination via le réseau cytosquelettique d'actine ou de microtubules (Figure 4). Le transport via le réseau du microtubule est assuré par les moteurs moléculaires dynéine et kinésine. Alors que la myosine, de type *She1p/Myo4p*, permet le transport sur les filaments d'actine (88, 89). Souvent, c'est la combinaison de ces quatre étapes qui mènent au transport et à la localisation subcellulaire d'un transcrite (90, 91). Une fois livrés à leur destination, les granules de transport d'ARNm seront désassemblés et l'ARNm demeure réprimé et protégé dans son site d'ancrage jusqu'à son éventuelle traduction (57).

Comme susmentionné, deux réseaux cytosquelettiques sont impliqués dans le transport actif des ARNm dans la cellule. Les moteurs moléculaires dynéine/kinésine assurent un transport de longues distances via le réseau de microtubules, tandis que la myosine est un moteur qui emprunte plutôt les filaments d'actine pour assurer le transport de courtes distances (92). Toutefois, une

collaboration entre les deux réseaux a été observée dans la localisation de certains messagers. En effet, l'acheminement de l'ARNm *Vgl* au pôle végétal de l'ovocyte de xénope est médié par le réseau de microtubules, alors que son ancrage au cortex est assuré par les filaments d'actines (93, 94). Le réseau d'actine est également utilisé au cours de la division cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* pour localiser l'ARNm *Ash1* à l'extrémité du bourgeon mitotique (Figure 5f) (53).

Chez la drosophile, le mécanisme du transport actif par la dynéine via le réseau de microtubules est également impliqué dans l'établissement des axes embryonnaires au cours de l'ovogenèse et ce, par la localisation des ARNm maternels, *Oskar* et *bicoid*, synthétisés par les cellules nourricières (58, 95). Tandis que le transport du messenger β -actine vers le lamellipode des fibroblastes en migration se fait grâce aux filaments d'actines. Le même transcrit est transféré dans la région distale du neurone par le réseau de microtubules (96, 97).

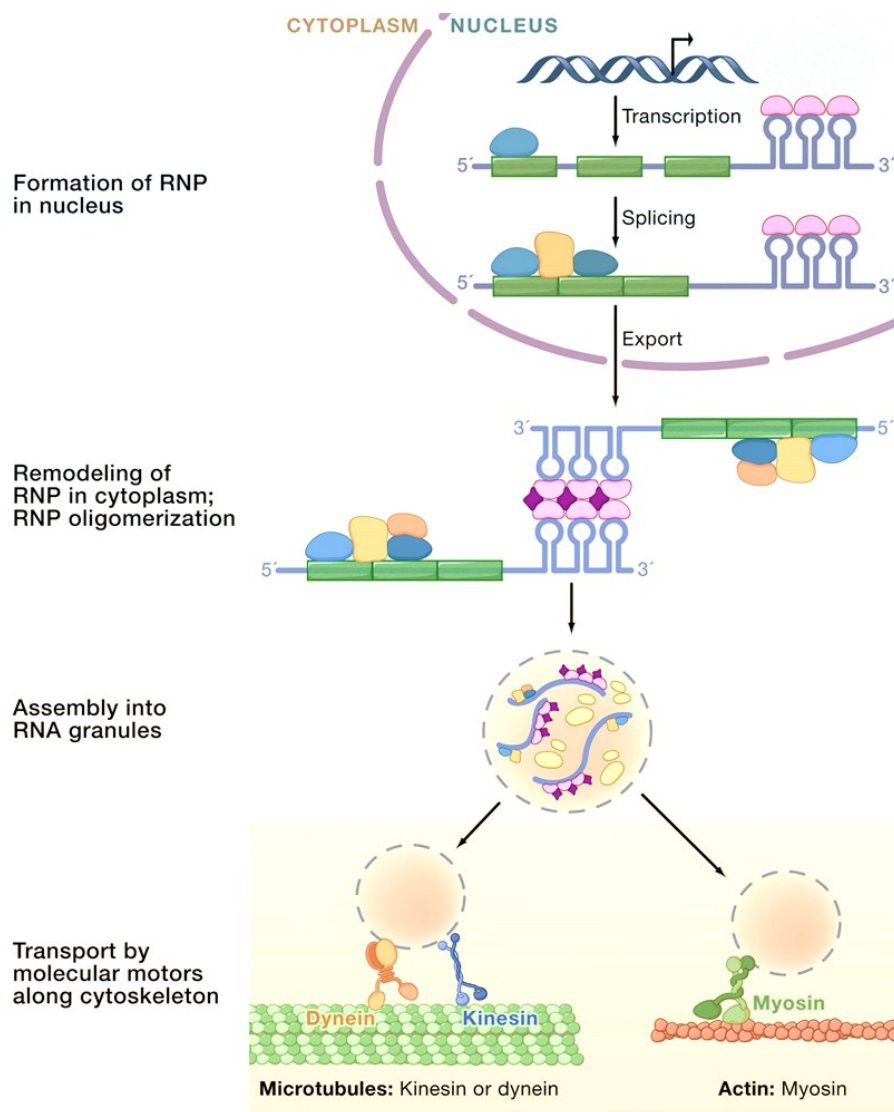


Figure 4. – Principales étapes de localisation des ARNm

La première étape est la formation des RNP dans le noyau. Étape deux consiste à l'oligomérisation des RNP dans le cytoplasme. La troisième étape est la formation de granules d'ARN. La dernière étape implique le transport des granules d'ARNm par des moteurs moléculaires sur le réseau de cytosquelette. Figure adaptée de la référence (89).

1.1.1.3.4.2 Dégradation et stabilisation

Ce mécanisme est défini comme une autre facette de la régulation post-transcriptionnelle basé sur la dégradation sélective des ARNm afin de restreindre l'expression protéique a des sites spécifiques. Ce processus dépend de la présence d'éléments d'instabilité et de protection contre la dégradation au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm.

Chez les cellules embryonnaires de la drosophile, ce phénomène permet de restreindre l'expression de certains gènes au pôle postérieur. D'ailleurs, seulement 4 % des ARNm *nanos* sont protégés contre la dégradation et localisés au niveau du pôle postérieur (83, 98). Les ARNm *nanos* non localisés sont repérés via leurs 3'UTR par la protéine de liaison à l'ARN Smaug qui recrute le complexe de la déadénylation CCR4/POP2/NOT déadénylase et entraîne sa déstabilisation. Cependant, au pôle postérieur, la protéine Smaug interagit avec *Oskar* permettant la traduction de l'ARNm *nanos* (Figure 5c) (99, 100). L'ARNm *hsp83* est un autre exemple de transcrit localisé par le mécanisme de la stabilisation locale par rapport à la dégradation générale des ARNm chez la drosophile (101). Ce mécanisme est souvent observé en combinaison avec d'autres mécanismes pour coordonner la localisation d'un ARNm donné.

1.1.1.3.4.3 Diffusion et ancrage

Ce mécanisme, qui pourrait être une alternative à la dégradation des transcrits non localisés, est basé sur la diffusion passive de l'ARNm dans le cytoplasme et son association aléatoire avec un facteur stabilisant permet sa localisation subcellulaire. Ce mécanisme est impliqué dans la localisation de plusieurs transcrits maternels lors de l'ovogenèse chez la drosophile, y compris *nanos*, *cyclin B*, et *germ cell-less* (101). En effet, la contraction des cellules nourricières lors de

l'ovogenèse crée un flot cytoplasmique facilitant la diffusion des ARNm *nanos* vers le pôle postérieur où ils seront fixés à leur point d'ancrage par les filaments d'actine. (Figure 5d) (85).

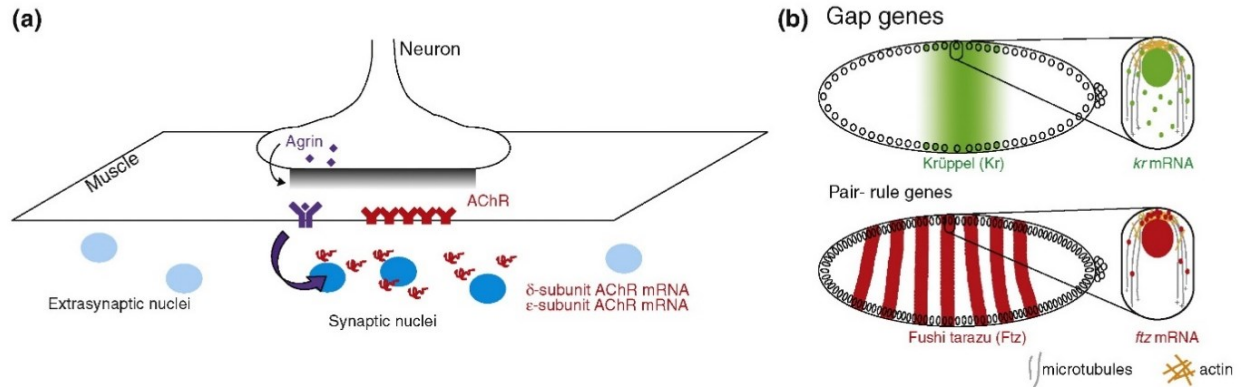
Chez le xénope, les ARNm *Xcat2*, et *Xdaz1* codent pour des protéines associées au *nanos*. Au début de l'ovogenèse, ces gènes sont localisés au cortex végétatif grâce à une voie appelée METRO « *MEssenger TRansport Organizing center* » qui implique le réseau mitochondrial pour piéger les ARNm (94). En outre, la localisation des ARNm *cyclinB1* et *Xbub3* au niveau du fuseau mitotique durant l'embryogenèse chez le xénope semble également être obtenue par un mécanisme de diffusion et d'ancrage (102).

1.1.1.3.4.4 Transcription localisée

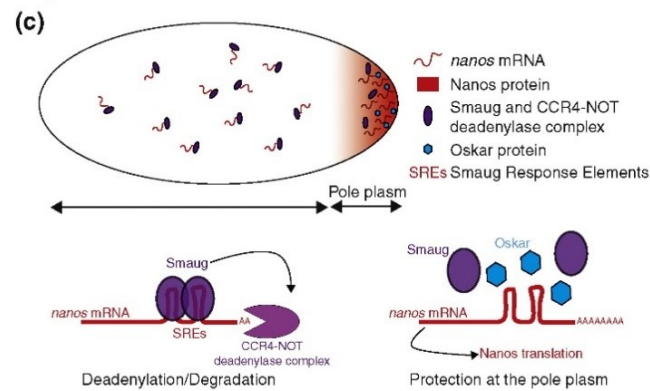
C'est un phénomène de production localisée des ARNm par une sous-population nucléaire dans un syncytium, soit une structure obtenue par la fusion de plusieurs cellules. En effet, la transcription locale de l'ARNm de l'acétylcholine aux noyaux localisés à proximité de la jonction neuromusculaire induit l'innervation des fibres musculaires (Figure 5a) (103, 104).

Lors du développement embryonnaire de la drosophile, l'ovocyte n'est qu'une grosse cellule entourée par une monocouche nucléaire ou blastoderme. Certains transcrits impliqués dans le développement des segments embryonnaires, comme l'ARNm *kriippel*, sont exportés par les noyaux pour être localisés à l'intérieur du syncytium embryonnaire. Cependant, d'autres ARNm, tel *fushi tarazu*, peuvent être transportés vers le pôle nucléaire apical par le réseau de microtubules (Figure 5b) (105, 106).

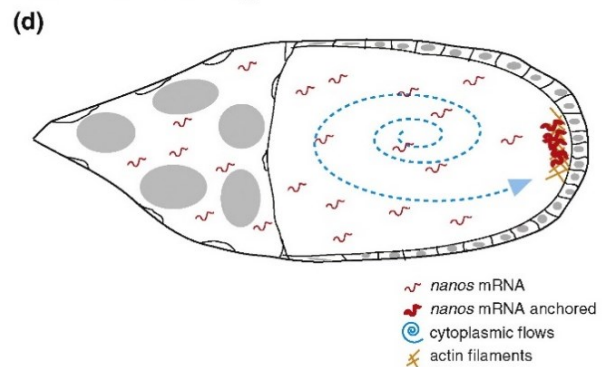
Localized transcription



Degradation and stabilization



Diffusion and anchoring



Active transport

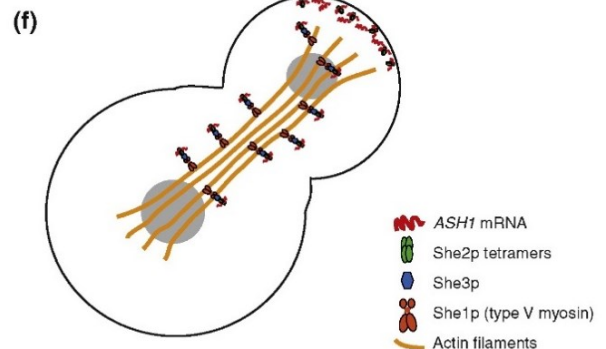
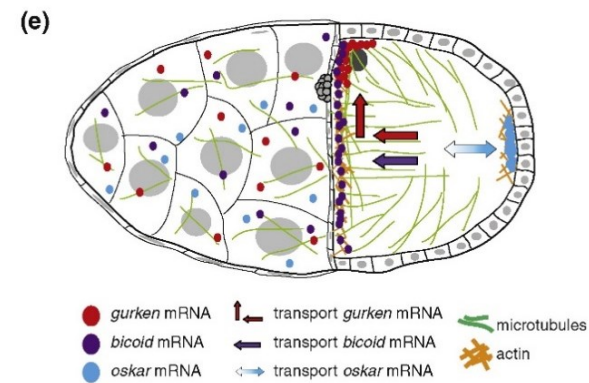


Figure 5. – Modèle conceptuel démontrant les mécanismes de la localisation des ARNm

(a) Transcription localisée de l'ARNm d'AChR dans la jonction neuromusculaire. (b) Transcription locale suivie d'un transport actif dans l'embryon de blastoderme syncytial de drosophile. (c) Dégradation et stabilisation. (d) Diffusion et ancrage. (e-f) Transport actif via les cytosquelettes. Figure tirée de (65).

1.1.1.3.5 Structures cellulaires ciblées par la localisation des ARNm

Comme mentionnée précédemment, l'expédition des ARNm à des compartiments subcellulaires spécifiques permet une régulation spatiotemporelle raffinée de la synthèse des protéines afin de répondre de manière plus rapide et plus efficace aux besoins de la cellule (107). Certaines structures cellulaires sont particulièrement ciblées par ce mécanisme.

Ainsi, le réticulum endoplasmique (RE) est un organe clé dans la traduction et un site majeur pour la localisation des ARNm codants pour des protéines contenant un peptide signal à l'extrémité N-terminale, telles les protéines membranaires (108, 109). La particule de reconnaissance du signal SRP « *Signal Recognition Particle* » est le complexe protéique intermédiaire entre l'ARNm, les ribosomes et les récepteurs du réticulum endoplasmique (110). Chez la levure, l'ARNm *Ash1* est colocalisé avec les marqueurs protéiques du RE sur les filaments d'actines (111). Dans les cellules humaines, les ARNm *HSP90B1*, *ATP6A2* et *AKAP1* sont enrichis avec leurs protéines dans le RE ainsi que dans la mitochondrie (112). D'ailleurs, la localisation des ARNm est nécessaire pour le bon fonctionnement de la mitochondrie. En effet, la délétion de la séquence MTE « *Mitochondria Targeting Elements* » à l'extrémité 3'UTR de l'ARNm *ATP2* entraîne des défauts respiratoires et fonctionnels de l'organe (113).

Bien que le réseau de microtubules est le moyen le plus utilisé dans le transport cellulaire de longues distances, plusieurs études suggèrent que cette structure pourrait également être une destination pour certains ARNm (89). En effet, il a été montré qu'une fraction de l'ARNm est spécifiquement localisée au niveau de microtubules mitotiques dans différents modèles cellulaires (39). Nous en discuterons plus en détail dans la section (1.1.2.3).

Le cytosquelette d'actine est également ciblé par la localisation de messagers. Les ARNm *Arp2/3* sont placés sur les filaments d'actines afin de moduler la migration cellulaire (43, 69). Des

événements similaires ont été rapportés pour les peroxysomes (l'ARNm *PEX14*) (114), l'endosome (l'ARNm *CREB*, *APIS2*) (112, 115), le noyau (l'ARNm *ASPM*, *SPEN*, *c-FOS* et *c-MYC*) (44), l'appareil de Golgi (l'ARNm *AKAP9*) et la protrusion (l'ARNm *KIF1C* et *MYH3*) (112).

1.1.1.3.6 Prévalence de la localisation des ARNm

Le trafic intracellulaire des ARNm ainsi que l'expression protéique localisée représentent un mécanisme clé dans la régulation de plusieurs processus biologiques chez différents organismes et types cellulaires. Cependant, plusieurs exemples liant la pathogenèse de la maladie humaine à des défauts de localisation de transcrits, ce qui souligne davantage l'importance critique de ce mécanisme de régulation de l'expression génique. Généralement, on distingue trois grandes classes de pathologies associées à des aberrations au niveau de la localisation des ARNm : neurodégénérative, neuromusculaire et tumorale (116-118).

1.1.1.3.6.1 Maladies neurodégénératives

Le syndrome de l'X fragile ou FXS « *Fragile X syndrome* » est une maladie génétique qui représente la forme héréditaire la plus commune de retard mental (119). L'insertion multiple de la séquence répétitive CGG ou TRED « *Trinucleotide Repeat Expansion Disorders* » dans la région 5' UTR du gène *FMRI* inhibe sa transcription, d'où la perte de la protéine FMRP et par conséquent son rôle dans la modulation des processus nécessaires pour la plasticité synaptique, telle que la signalisation glutamatergique ainsi que la localisation et la traduction des ARNm dans les dendrites. Ces fonctions sont clairement perturbées chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile (119-123). Par le même phénomène, la multiplication des répétitions GGGGCC dans le gène *C9ORF72* entraîne la formation des agrégats d'ARN et de RBP associés aux maladies de la

sclérose latérale amyotrophique (ALS). L'expansion de *C9ORF72* est également la principale cause de la maladie génétique de dégénérescence lobaire fronto-temporale: la démence fronto-temporale ou FTD « *Frontotemporal lobar degeneration* » (124, 125). Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par la formation des inclusions cytoplasmiques de la protéine TDP-43 « *TAR DNA-binding protein 43* » (126, 127). TDP-43 est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, principalement la stabilisation, l'export nucléaire et la localisation d'ARNm, notamment dans les neurones. La séquestration cytoplasmique de la TDP-43 entraîne une perte de ses fonctions dans le noyau (128, 129).

1.1.1.3.6.2 Maladies neuromusculaires

Le trouble génétique de l'atrophie musculaire spinal SMA « *Spinal Muscular Atrophy* » est caractérisé par une dégénérescence des motoneurones spinaux conduisant à une perte progressive de la fonction musculaire et une paralysie (130). Dans la plupart des cas, le SMA est causé par des mutations du gène *SMN1* codant pour la protéine SMN « *Survival of Motor Neuron* ». Ce facteur est nécessaire pour la formation du complexe snRNP « *small nuclear RNP* », soit un composant principal de spliceosome. Ces données suggèrent que l'épissage défectueux du pré-ARNm est responsable du SMA (131). Cependant, plusieurs autres études ont également montré que la distribution aberrante de SMN perturbe la localisation et la traduction des ARNm axonaux et cause le SMA (132, 133).

Un autre TRED qui a été lié à la localisation aberrante de l'ARNm chez les patients de la Dystrophie Myotonique de type 1 ou DM1 « *Myotonic Dystrophy type 1* ». Cette maladie neuromusculaire implique l'introduction des séquences répétitives multigéniques CUG dans la région 3' UTR de l'ARNm *DMPK* « *Dystrophia Myotonica protein kinase* » ce qui entraîne sa

rétenion dans des agrégats nucléaires avec plusieurs autres RBP de la famille MBLN « *muscleblind-like* » qui sont impliquées dans la régulation de l'épissage et la localisation des ARNm (134-136).

Un autre exemple de maladie causée par des défauts d'exportation et de localisation des ARNm, c'est le syndrome de contracture congénitale létale ou LCCS « *Lethal Congenital Contracture Syndrome* » causée par la mutation de GLE1, soit un médiateur important d'export nucléaire des transcrits (137). En outre, la maladie des os cassants OI « *Osteogenesis Imperfecta Type I* » est également causée par la non-localisation de l'ARNm *COL1A1* à la suite de défauts d'épissage de l'intron 26 (138).

1.1.1.3.6.3 Cancer

La distribution défectueuse de l'ARNm pourrait également être impliquée dans l'étiologie du cancer. Ainsi, la perte de la polarité cellulaire est une caractéristique déterminante des cellules cancéreuses. À la lumière des rôles de la localisation de l'ARNm dans l'organisation cellulaire asymétrique, l'aberration de ce mécanisme pourrait représenter un événement primaire conduisant à une désorganisation tissulaire, une invasion tumorale et à des métastases (139). Ce phénomène est observé chez les cellules épithéliales. La polarisation cellulaire établie sur l'axe apico-basal est perturbée dans la majorité des cancers d'origine épithéliale (140, 141).

Des études menées sur les cellules épithéliales mammaires de la souris montrent que la protéine CPEB « *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein* » est un facteur de régulation de la traduction impliqué dans la localisation apicale des ARNm *ZO-1* et *claudin-3*. Ces transcrits codent pour des protéines de la jonction serrée et des protéines impliquées dans le maintien de la polarité cellulaire (142). D'ailleurs, la perte de CPEB entraîne la perte de polarité

cellulaire. De plus, il a été montré que la dérégulation de la localisation de *ZO-1* est associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (143).

La protéine TDP-43 est également impliquée dans le cancer. En effet. Les études de biopsies sur des sites d'inflammation musculaires ont montré que TDP-43, associée à ses ARNm cibles, se colocalise avec les lymphocytes T dans de larges inclusions séquestrées au niveau sarcoplasmique, alors que dans les cellules musculaires normales, TDP-43 est majoritairement nucléaire. D'autres résultats suggèrent que la surexpression de TDP-43 joue un rôle dans la progression du cancer du col de l'utérus et dans le neuroblastome (144, 145).

1.1.1.4 Complexes de transport et d'entreposage des ARN

Tout au long de son cycle métabolique, les ARNm sont regroupés avec leurs régulateurs en *trans* dans des inclusions granulaires généralement cytoplasmiques et non délimitées par une membrane. La composition diversifiée de ces complexes ribonucléoprotéiques et leur implication dans la régulation d'une panoplie de processus cellulaires et moléculaires rendent la mission de leurs classifications difficile. En effet, plusieurs fonctions peuvent être régulées par le même complexe. De plus, plusieurs transcrits font partie de plusieurs types d'inclusion à la fois. Il en est de même pour les facteurs de régulation en *trans* qui transitent entre les RNP de façon dynamique (146). Dans cette section, nous discuterons les grandes catégories des inclusions impliquées dans le transfert, la localisation et l'entreposage des ARN.

1.1.1.4.1 Granules et particules de transport

Dans certains types cellulaires, particulièrement les neurones, l'expression d'une protéine synaptique implique le voyage de son transcrit le long de l'axone pour arriver à cet endroit où son

action est requise (147). Afin d'être expédiées, les séquences *cis* des ARNm s'associent à des facteurs *trans* et forment des mRNP qui s'agglomèrent en complexes de transport via des interactions protéine-protéine en général (Figure 6) (148). Ainsi, on distingue au moins deux complexes de transport des ARNm, soit les granules et les particules. Les granules comprennent des transcrits associés aux polysomes dont l'activité traductionnelle est réprimée au niveau de l'élongation. Cependant, certains granules sont des sites actifs de la synthèse protéique (147, 149). Contrairement aux granules, la composition des particules de transports exclut les polysomes. L'activité traductionnelle des ARNm s'en trouve donc réprimée en phase d'initiation (150). Par ailleurs, le trafic intracellulaire de ces complexes de transport est assuré par des moteurs moléculaires via le réseau du cytosquelette. Enfin, il est important de préciser que la motilité des granules de transport est restreinte par rapport à celle des particules, et ce, à cause de leur grosse taille (Figure 6) (89, 151).

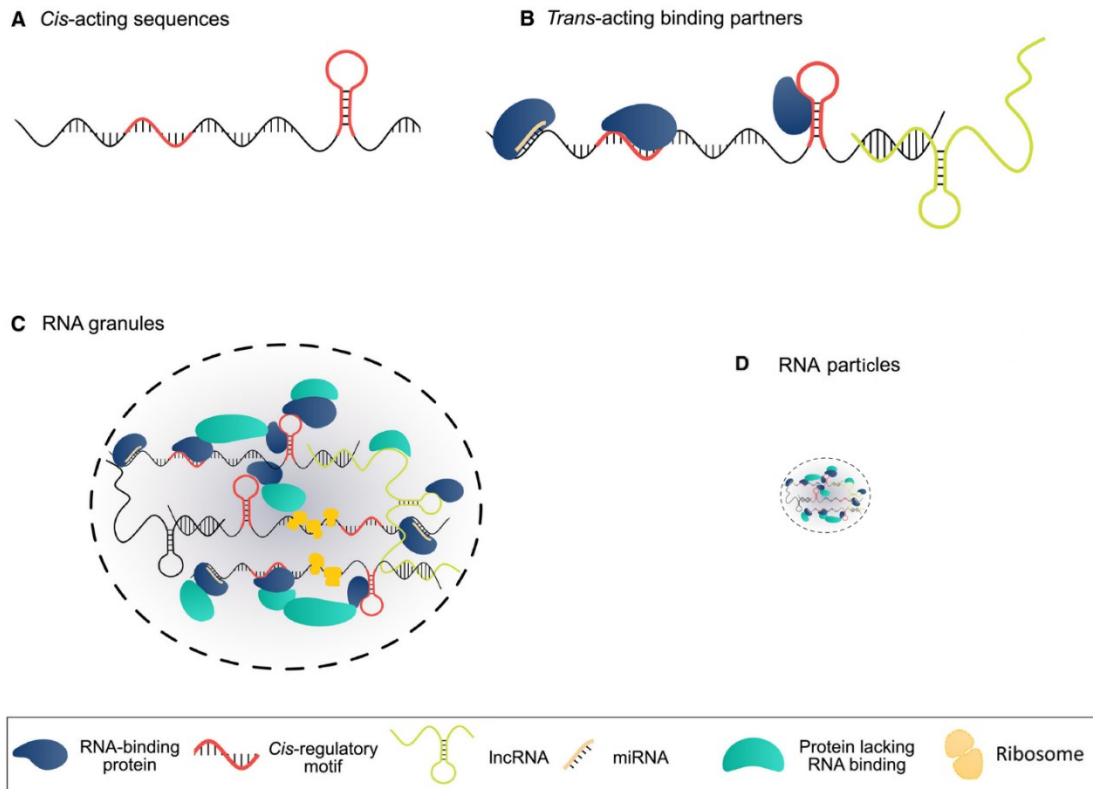


Figure 6. – Illustration schématique des granules et particules de transport

(A) Séquences *cis* linéaires ou en tige boucle, représentées en rouge. (B) Facteurs *trans* lient l'ARN pour moduler sa localisation. (C) Granule d'ARN. (D) Particules d'ARN. Adaptée de (129).

1.1.1.4.2 Granules de stress

Les granules de stress sont des complexes cytoplasmiques observés lors d'une réponse cellulaire au stress et qui disparaissent une fois celui-ci résorbé. Ces inclusions constituent un lieu d'entreposage temporaire des ARNm afin de les protéger de la dégradation engendrée par le stress cellulaire (152). De plus, les granules de stress comprennent bien entendu des ARNm inhibés à l'étape d'initiation, des facteurs protéiques (ex. G3BP1, TIA-1), ARN non codants, des facteurs de traduction (ex. eIF4F, eIF4G, eIF3) ainsi que de petites sous-unités ribosomales (153-155). Au

retour à la normale, et selon les besoins cellulaires, les transcrits subissent un triage soit vers la traduction soit vers la dégradation (156). Étant donné que les granules de stress ne contiennent pas tous les composants de la machinerie de dégradation des ARNm, certains transcrits peuvent être dirigés vers les P-bodies afin d'être dégradés (147, 150, 157, 158).

1.1.1.4.3 P-bodies

Les P-bodies « *Processing-bodies* » sont des inclusions cytoplasmiques très dynamiques et présentes dans les cellules même à l'état basal. Ces structures constituent un lieu de stockage et de dégradations des ARNm (158, 159). Contrairement aux granules de stress les P-bodies comprennent tous les membres de la machinerie de dégradation de l'ARN, à l'exception de l'exosome. Cependant, ces inclusions ne contiennent aucune sous-unité ribosomale (153, 158, 160).

Les granules de stress et les P-bodies interagissent malgré toutes les différences dans leurs processus de formation et leurs fonctions. En effet, il existe une collaboration entre les granules de stress et le complexe RISC médié par Ago2 et les microARN. Certains ARNm réprimés par ce complexe sont trouvés au sein des P-bodies (161). Ces deux particules cytoplasmiques jouent un rôle crucial dans l'adaptation cellulaire aux stress, et ce, via la répression ou l'activation de la traduction des messagers. Les ARNm séquestrés dans les granules de stress peuvent être transférés aux P-bodies pour le triage avant d'être recyclés « *turnover* » ou découpés (Figure 7). Le processus de recyclage des ARNm est essentiel pour les réponses synaptiques, d'où la présence des P-bodies dans les dendrites (158, 159, 162, 163).

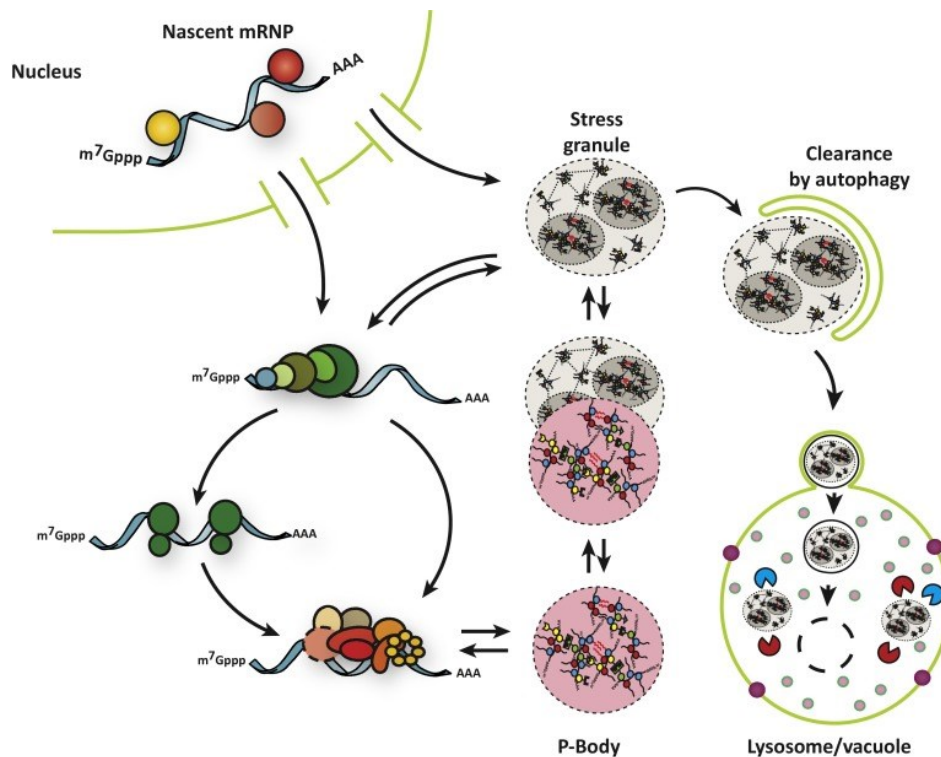


Figure 7. – Interaction dynamique entre les granules de stress et les P-bodies

Les granules de stress contiennent des ARNm et des RBP qui peuvent interagir avec les p-bodies, échanger des composants avec le cytoplasme et subir l'autophagie. Figure tirée de la référence (163).

1.1.1.4.4 Vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont au cœur d'un concept émergent et correspondent à une population hétérogène d'inclusion nanoscopique associée à la communication intercellulaire. Leur structure est constituée d'une bicouche lipidique qui contient des protéines et des ARN (164). Ces vésicules agissent comme des complexes d'échafaudage. Elles ont la capacité de voyager dans le liquide biologique de l'environnement extracellulaire pour rejoindre la cellule réceptrice et lui délivrer ses contenus par endocytose. Ces contenus sont capables d'induire des changements majeurs dans la cellule réceptrice, tels que la stimulation de la prolifération, l'angiogenèse ainsi

que le développement et la progression tumorale (165-167). De plus, les transcriptomes de ces vésicules diffèrent dramatiquement entre les différents types cellulaires ainsi qu'entre les sous-populations issues de la même cellule. Ce mécanisme de régulation est conservé de la drosophile à l'humain.

Parmi les ARN identifiés dans les vésicules extracellulaires, on peut trouver les ARNm, miRNA, ARNr, snoRNA, lncRNA, ARN circulaire ainsi que des ARNt (149, 168, 169).

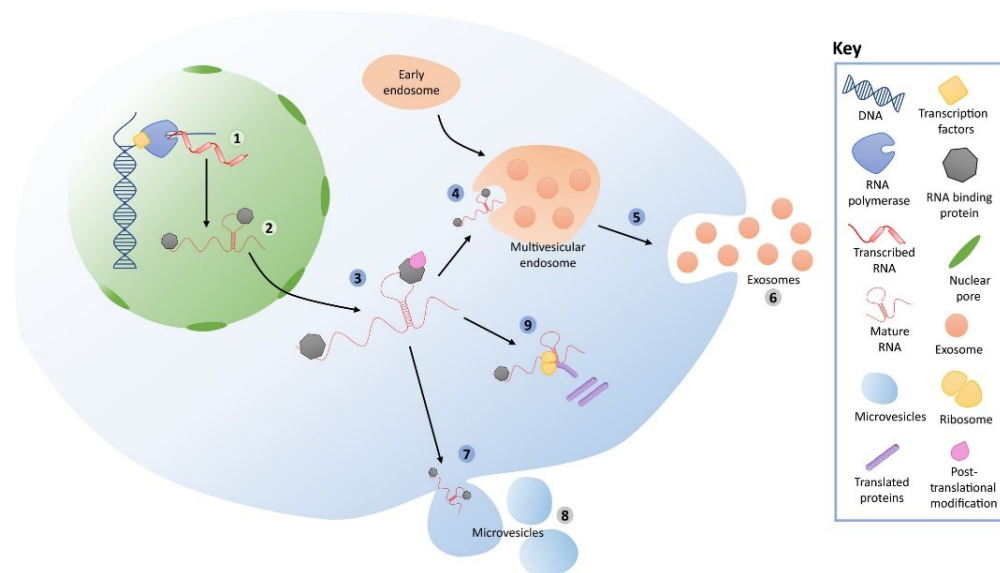


Figure 8. – L'implication des vésicules extracellulaires dans la localisation des ARN

Les transcrits interagissent avec des RBP dans des endosomes. Les vésicules extracellulaires fusionnent avec la membrane cellulaire pour se libérer dans l'espace extracellulaire (129).

1.1.1.5 Facteurs influençant la stabilité des ARNm

La stabilité et la traduction des ARNm sont influencées par plusieurs éléments situés essentiellement dans les régions non traduites de l'ARNm (Figure 9).

1.1.1.5.1 Coiffage et polyadénylation

Le premier évènement de stabilité subit par le pré-ARNm est l'ajout d'une coiffe au niveau de l'extrémité 5' du transcrit. Cette modification co-transcriptionnelle vise à protéger le transcrit contre la dégradation par les exonucléases, à recruter le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et à faciliter l'export nucléaire des ARNm (8, 11). Une autre modification nucléaire exécutée sur le pré-ARNm pour moduler sa stabilité consiste à l'insertion d'une séquence poly-A au niveau de la région 3' UTR des messagers. Ce segment sert à recruter les protéines de la famille PABP « *poly(A)-binding proteins* ». En effet, il existe quatre variants de PABP: PABPN1 étant nucléaire, et les trois autres étant cytoplasmiques, PABPC1, PABPC3 et PABPC4. La protéine PABPN1 est responsable de l'activation de la poly-A polymérase permettant ainsi l'élongation de cette séquence poly-A. De plus, elle est impliquée dans la translocation nucléocytoplasmique des ARNm (19). Alors que les trois PABPC sont impliqués dans la stabilité des transcrits et leur traduction grâce au recrutement des facteurs d'initiation de la traduction eIF4G et eIF4E ainsi que les sous-unités ribosomales au niveau de l'extrémité 5' (170). La formation du complexe PABP-eIF4G-eIF4E empêche l'enlèvement de la coiffe de l'extrémité 5' du transcrit (171, 172), recrute le facteur de terminaison de la traduction eRF3 « *eukaryotic Release Factor 3* » (171, 173) et empêche l'accès des enzymes de déadénylases afin de préserver les messagers de la déadénylation qui bloque le recrutement de la machinerie de traduction et entraîne la dégradation (174).

1.1.1.5.2 ARN non codants

Les ARN non codants sont des ARN transcrits de l'ADN génomique, mais ne seront pas traduits en protéine. On distingue deux grandes classes d'ARN non codant selon le nombre des nucléotides : petits ARN ou « *small RNA* (<200 nt) » et long ARN non codant ou lncRNA « *long*

non-coding RNA (>200 nt) ». La classe des petits ARN renferme l'ARNt « *transfer RNA* », snRNA « *small nuclear RNA* », snoRNA « *small nucleolar RNA* », piRNA « *PIWI-interacting RNA* » et miRNA « *micro RNA* » (175).

Les ARN non codants peuvent jouer un rôle dans la modulation de la stabilité des ARNm. En effet, les microARN s'associent à son ARNm cible grâce à leur séquence *seed* située entre les nucléotides 2 à 8 dans la région 5'. L'appariement parfait du microARN avec son messenger cible entraîne la dégradation de celle-ci par clivage endonucléolytique. Cependant, la majorité des microARN s'apparient de façon imparfaite avec leur cible et inhibe la synthèse protéique soit par la répression de la traduction soit par l'accélération de la déadénylation et l'enlèvement de la coiffe avant d'acheminer les transcrits vers les P-bodies pour être dégradé (153, 176-179). En outre, les lncRNA et miRNA peuvent se lier à certains RBP et saturer leur domaine de liaison à l'ARN (RBD), ce qui empêche la fixation de ses ARNm cibles. Cette association permet aux lncRNA de jouer le rôle d'échafaudage des RNP et de répresseur de traduction des ARNm associés (180, 181). Par ailleurs, la liaison des microARN au niveau de la région 5' UTR des transcrits est associée à une activation de la traduction (178).

Enfin, les courts ARN interférents (siARN), qui sont des ARN non codants, sont également impliqués dans la déstabilisation des transcrits. siARN est impliqué dans le clivage endonucléolytique de l'ARNm via la protéine Argonaute 2 (AGO2). Ce clivage produit deux fragments sensibles aux exonucléases (182).

1.1.1.5.3 ARE « *Adenylated-Uridylated Rich Elements* »

Les ARE « *AU-rich elements* » qui sont définis comme l'élément cis le mieux caractérisé pour moduler la stabilité des ARNm. Il s'agit de séquences riches en adénosine et en uracile (au

moins AUUUA) retrouvées généralement dans la région 3' UTR des ARNm à courte demi-vie codants pour des facteurs de croissance et des cytokines (183).

Les implications des ARE sur les transcrits sont dictés par le type de facteurs *trans* qui s'y fixe ou ARE-BP « *ARE-Binding Proteins* ». Certains ARE-BP présentent l'originalité de pouvoir à la fois augmenter la stabilité et induire la dégradation des ARNm. La protéine de liaison à l'ARN HuR « *human antigen R* » appartient à cette classe. Elle interagit avec l'ARE de l'ARNm *p53* pour induit sa stabilité et sa traduction (184). Cependant, elle entre en compétition avec la liaison des facteurs déstabilisants sur le motif ARE de l'ARNm *p21* pour le protéger contre la dégradation (182, 185). L'ARE-BP AUF1 « *AU-rich element RNA-binding protein 1* » s'associe aussi avec la séquence ARE dans la région 3' UTR de l'ARNm *p21* pour induire sa dégradation par la voie AMD « *ARE mediated RNA decay* » basée sur le recrutement des exosomes (186, 187). Certains ARE-BP sont retrouvés dans des granules de stress (TIA-1, TIAR) et/ou des P-bodies (HuR, TTP) (188). Les transcrits réprimés stockés lors d'un stress cellulaire dans les granules de stress seront soit recyclés soit acheminés vers les P-bodies pour être dégradés. Il est également important de souligner que la stabilité et la traduction peuvent être médiées par une collaboration entre ARE-BP et microARN qui se lient à des éléments distincts sur le même transcrit cible (189).

Il est important de souligner que les GRE « *Guanylated-uracylated Rich Elements* » sont également des éléments impliqués dans la stabilité et la traduction des ARNm et partagent plusieurs similitudes avec les ARE. Ils possèdent un consensus minimal de onze nucléotides (UGUUUGUUUGU). Les GRE-BP peuvent être impliqués dans la maturation des pré-ARNm, la traduction et la dégradation des ARNm. La dégradation de l'ARNm C/EBP « *CCAAT-enhancer-binding proteins* » est médiée par la protéine CUG-BP1 « *CUG triplet repeat, RNA-binding protein 1* » de la famille des protéines CELF « *CUG-BP- and ETR-3-like factors* » (190, 191).

1.1.1.5.4 IRES « *Internal Ribosomal Entry Site* »

Les sites d'entrée interne des ribosomes ou IRES « *Internal Ribosomal Entry Site* » sont des séquences qui permettent l'initiation de la traduction de certains transcrits via le recrutement direct de la sous-unité ribosomale 40s indépendamment de la coiffe 5'UTR et du facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Les éléments IRES se trouvent souvent dans la région 5'UTR, mais ils peuvent également se retrouver ailleurs sur l'ARNm (192, 193).

À ce jour, plusieurs IRES ont été caractérisées. L'interférence de la protéine HnRNP A1 avec les séquences ARE et les éléments IRES lui confère un rôle dans la stabilité et la traduction respectivement (192). En effet, HnRNP A1 induit la stabilité des ARNm de l'interleukine 2 (IL-2) et de GM-CSF « *GranulocyteMacrophage Colony-Stimulating Factor* ». Cependant, l'interaction d'HnRNP A1 avec l'IRES de l'ARNm du facteur de croissance des fibroblastes FGF-2 « *human fibroblast growth factor 2* » favorise sa traduction (192, 193). L'introduction des mutations dans la protéine HnRNP A1, afin de minimiser son affinité aux IRES, entraîne une baisse dans la traduction des ARNm ciblés par leurs IRES (194).

Les microARN collaborent également avec IRES-BP pour moduler la traduction de certains transcrits en commun. En effet, le miR-16 « *microRNA 16* » s'associe avec l'IRES-B de l'ARNm VEGF « *Vascular Endothelial Growth Factor* » pour inhiber sa traduction (195).

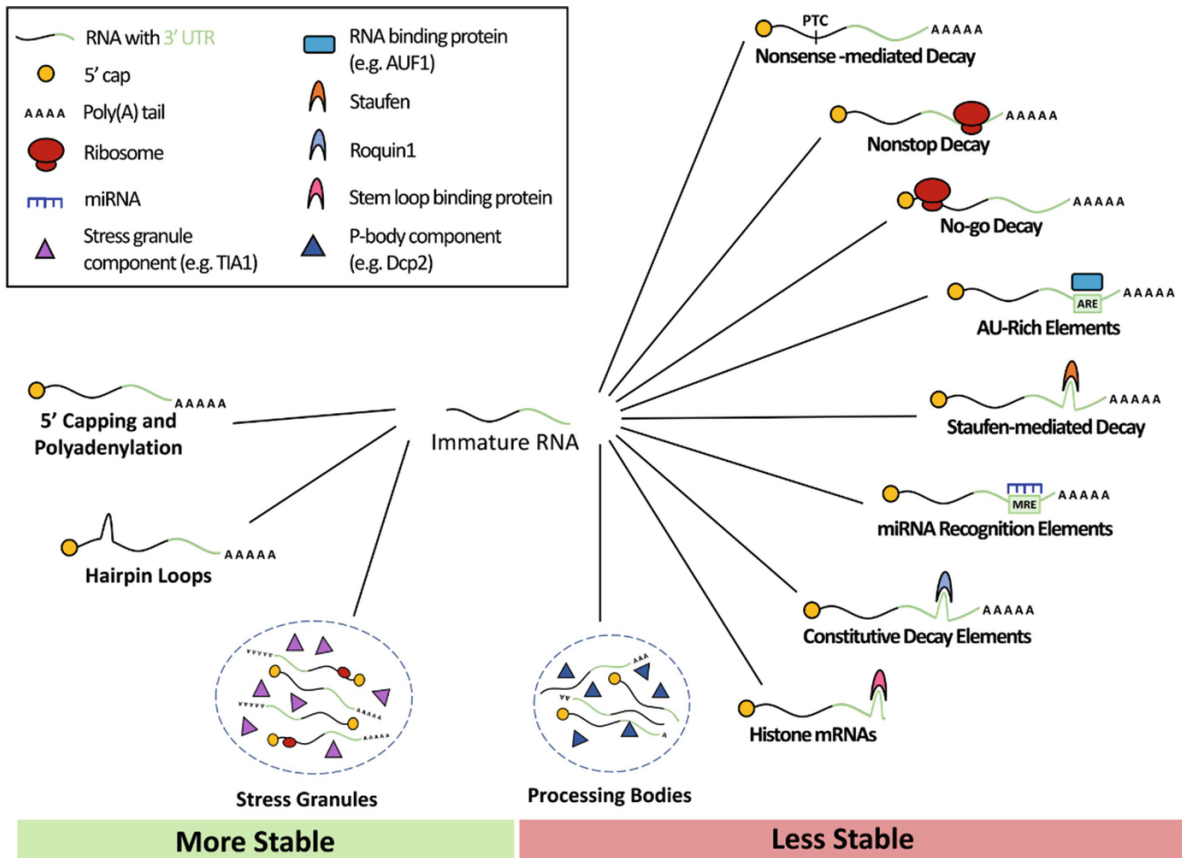


Figure 9. – Schéma récapitulatif des mécanismes responsables de l’homéostasie des ARN

Ce schéma représente les différentes voies responsables de la stabilité de l’ARN. Après sa transcription, le pré-ARNm est stabilisé par (i) l’ajout d’une coiffe en 5’ et une queue polyA en 3’ (ii) la formation d’une structure secondaire et (iii) séquestrée et stabilisée dans des granules de stress. À droite du schéma, on trouve les différentes voies d’élimination de l’ARN: (i) *Non-stop Decay* pour dégrader les transcrits contenant des codants stops prématurés et les transcrits avec défauts d’arrêt de traduction (ii) *No-Go Decay* pour les défauts d’initier la traduction (iii) l’abondance des transcrits est contrôlée par plusieurs éléments 3’UTR dont l’AU-rich éléments, SBS « *Staufen Binding Site* », miRNA, et les éléments de dégradation constitutifs. Finalement, les ARN peuvent être séquestrés et déstabilisés par les P-bodies. Figure tirée de la référence (196).

1.1.1.6 Traduction

Arrivé à destination, l'ARNm sera relargué du complexe de localisation et traduit en protéine sur trois phases simultanées, l'initiation, l'élongation et la terminaison (Figure 10A) (57, 197, 198)

1.1.1.6.1 Phase d'Initiation

Elle correspond à la phase de reconnaissance du codon initiateur de la traduction sur l'ARNm et le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction eIF « *Eukaryotic Initiation Factor* », les sous-unités ribosomales et les ARN de transfert (ARNt) au niveau de la coiffe. La linéarisation du 5'UTR de l'ARNm est assurée par l'activité hélicase du facteur eIF4A. Les facteurs eIF4F et eIF4B jouent le rôle de guide pour recruter le complexe de préinitiation 43S (40s, eIF3, eIF1 et eIF1A eIF2-GTP et l'ARNt méthylé) sur le site en aval de la coiffe en 5'UTR du transcrit (199). Le facteur d'échafaudage eIF4G interagit avec la protéine PABP « *Poly(A)-Binding proteins* », associée à la séquence poly-A dans la région 3'UTR. Cette association est nécessaire pour le recrutement de la sous-unité ribosomale 60s (200, 201).

Le complexe 48S (complexe 43S et les eIF4) balaie l'extrémité 5'UTR de l'ARNm jusqu'à trouver le codon initiateur de la traduction, généralement AUG situé dans une séquence nucléotidique appelé contexte de Kozak (170, 202). Les facteurs eIF2 sont alors dissociés du complexe tandis que l'ARNt complémentaire du codon d'initiation s'embarque. Enfin, l'ajout du facteur eIF5B au complexe stable 48s est nécessaire pour le recrutement de la sous-unité ribosomale 60s et le relargage de facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. La machine ribosomale est alors prête à amorcer la synthèse protéique (Figure 10B) (203-206).

1.1.1.6.2 Phase d'Élongation

Elle correspond au déplacement unidirectionnel du ribosome le long de l'ARNm en déchiffrant au fur et à mesure les codons. Le ribosome se décale de trois nucléotides (triplet) et positionne dans le site vacant l'ARNt correspondant. Ce dernier se lie via sa séquence anticodon à un codon du transcrit et entraîne l'accrochage séquentiel des acides aminés de la protéine en voie de synthèse. La production de la chaîne polypeptidique est catalysée par l'activité peptidyl-transférase. De plus, plusieurs autres facteurs sont impliqués dans le contrôle de l'élongation comme les facteurs eEF. En effet, le facteur eIF1A est activé par eIF1B pour placer les ARNt dans les sites correspondants (Figure 10C) (199). Cependant, le facteur eEF2 est nécessaire pour déplacer les ARNt afin de promouvoir la translocation ribosomale sur le transcrit (207).

1.1.1.6.3 Phase de Terminaison et recyclage

C'est la phase qui correspond à l'arrêt de la translocation ribosomale par un codon-stop qui ne concorde à aucun acide aminé. Il en existe trois dans le code génétique : UAA, UGA ou UAG. De plus, il n'y a pas des ARNt avec des anticodons correspondants à ces triplets.

Deux facteurs de la famille eRF sont principalement impliqués dans la régulation de cette phase, soit le facteur eRF1 et eRF3. Le facteur eRF3 hydrolyse la molécule de GTP en GDP pour stimuler l'activité d'eRF1 dans la reconnaissance du codon-stop et le relargage de la protéine via l'hydrolyse de la liaison entre le dernier ARNt et la chaîne polypeptidique en voie de biosynthèse (208). Après le clivage du polypeptide, l'action combinée des facteurs eRF1 et ABCE1 « *ATP-binding cassette E1* » permet de recycler les composants de la machinerie ribosomale afin d'être utilisés dans de nouveaux cycles de traduction. Enfin, il importe à mentionner qu'une molécule

d'ARNm peut être liée par nombreux ribosomes simultanément dans une structure de polysome, et ce, pour augmenter l'efficacité de la traduction (171, 173) (Figure D).

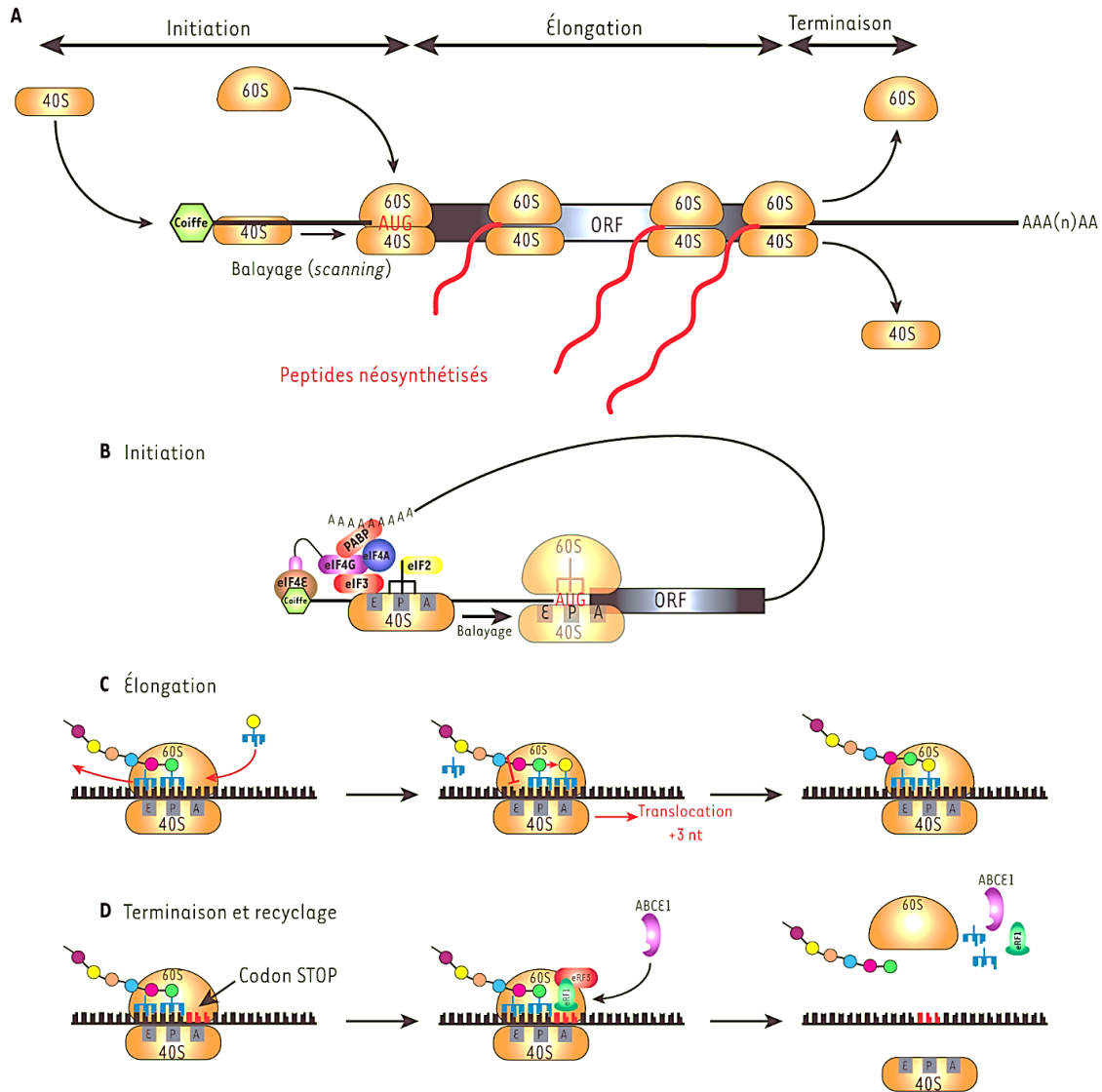


Figure 10. – Les étapes de la traduction chez les eucaryotes

(A) les trois étapes de la traduction. (B) Initiation. (C) Élongation. (D) Terminaison et recyclage. ORF: *Open Reading Frame*; nt: nucleotide. Figure tirée de la référence (209).

1.1.1.7 Mécanismes de surveillance des ARNm

Définis comme des mécanismes de contrôle-qualité co-traductionnels très performants, les mécanismes de surveillance de l'ARNm permettent la détection puis l'élimination des transcrits aberrants et les ARNm en fin de demi-vie. Généralement, il existe trois mécanismes de dégradation des ARNm: la voie NMD, la voie NGD et la voie NSD (Figure 11).

1.1.1.7.1 NMD « *Nonsense-Mediated Decay* »

La voie NMD « *Nonsens-Mediated Decay* » est un mécanisme de dégradation des ARNm couplé à la terminaison de la traduction. Ce mécanisme cible les transcrits contenant un codon-stop prématuré ou PTC « *Premature translation termination codon* » afin d'empêcher la synthèse d'un produit protéique anormal qui pourrait être délétère pour la cellule (176, 210-213). Ce mécanisme a été retrouvé chez tous les eucaryotes étudiés (176). Chez l'homme, le premier facteur impliqué dans NMD qui a été cloné c'est la protéine UPF1 « *Up-Frameshift* ». La liaison de cette dernière aux facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF2 est médiée par son interaction avec le complexe EJC via le dimère UPF2/UPF3. La phosphorylation d'UPF1 par la kinase SMG1 « *Suppressor with Morphological effect on Genitalia* » entraîne la répression de la traduction, la liaison de l'endonucléase SMG6 et le recrutement des enzymes de clivages. L'ARNm est donc dirigé vers la voie de dégradation (Figure 11 A) (214-216).

1.1.1.7.2 NGD « *Non-Go Decay* »

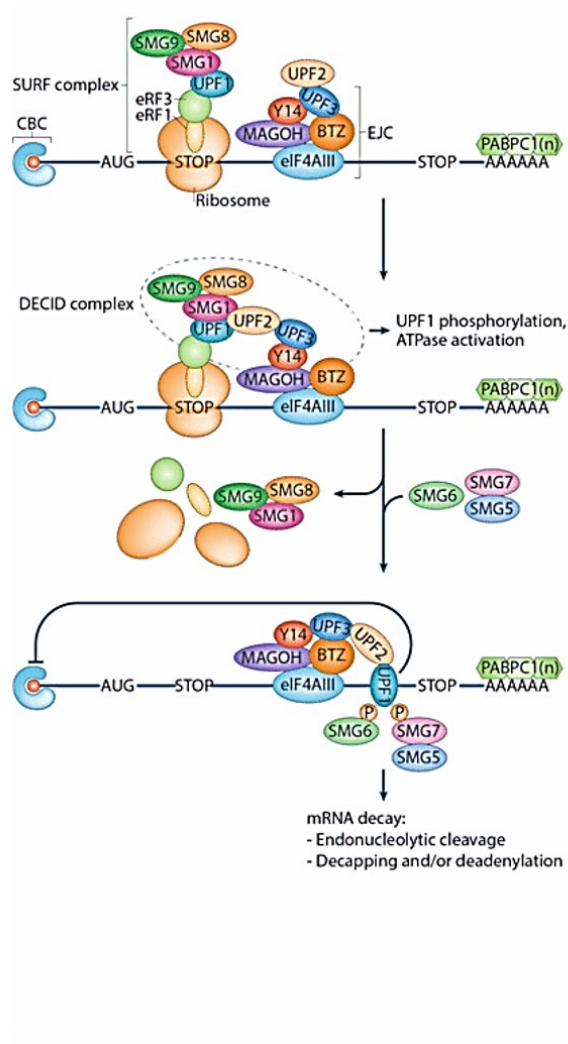
La voie de dégradation NGD « *No-Go Decay* » est un mécanisme de surveillance co-traductionnel des ARNm. Ce mécanisme dédié à la dégradation des transcrits induisant un arrêt de la machinerie ribosomale lors de l'élongation. Il peut s'agir d'un transcrit tronqué, une structure

secondaire ou tertiaire qui gêne la progression du ribosome, une dépurination ou un codon-stop rare. En outre, les protéines partenaires Dom34 et Hbs1 sont recrutées sur le transcrit défectueux, ce qui déclenche un clivage endonucléolytique et les fragments générés sont dégradés par Xrn1 et l'exosome. Les protéines Dom34 et Hbs1 sont homologues respectivement aux facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (217-220). Le complexe Dom34-Hbs1 induit la dissociation des sous-unités ribosomiques et la libération du polypeptide aberrant, ce qui aboutit à sa dégradation par l'exoribonucléase Xrn1 et l'exosome (Figure 11 B) (219, 221, 222).

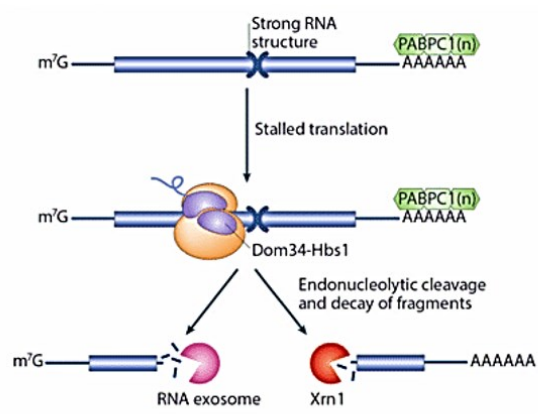
1.1.1.7.3 NSD « *Non-Stop Decay* »

Le mécanisme NSD « *Non-Stop Decay* » est dédié pour la dégradation des ARNm qui ne possèdent pas un codon de terminaison (223). Tout comme le NGD, le complexe Dom34/Hbs1 joue un rôle primordial dans NSD en permettant la dissociation des sous-unités ribosomales et le clivage endonucléolytique des transcrits dépourvu du codon-stop (219, 224). Ceci entraîne alors la dégradation de ces transcrits dans le sens 3'-5' par l'exosome et dans le sens 5'-3' par l'exonucléase Xrn1. Les deux dégradations requièrent une déadénylation préalable. Cependant, l'enlèvement de la coiffe par Dcp2 « *Decapping Complex* » est requis exclusivement dans la dégradation 5'-3' (Figure 11 C) (225, 226).

A Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)



B Non-go mRNA decay (NGD)



C Non-stop mRNA decay (NSD)

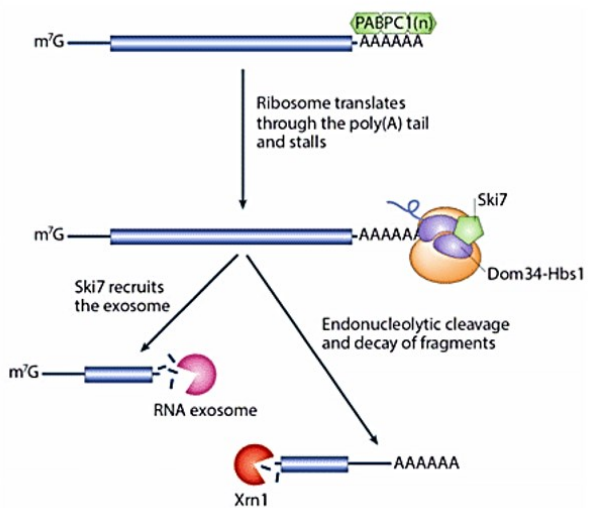


Figure 11. – Voies de dégradation des ARNm

(A) la voie NMD « *Non-sens Mediated Decay* ». (B) La voie NGD « *No-Go Decay* » et (C) La voie NSD « *Non-Stop Decay* ». Figure tirée de la référence (182).

1.1.2 Régulation post-transcriptionnelle du cycle cellulaire et de la mitose

1.1.2.1 Aperçu sur le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire décrit le mécanisme universel de duplication cellulaire. Il consiste à un ensemble ordonné d'événements par lesquels la cellule duplique son contenu et se divise en deux. Deux grandes étapes ont été définies par rapport aux événements majeurs de la vie de la cellule, soit l'interphase et la mitose (Figure 12) (227).

1.1.2.1.1 Interphase

Durant l'interphase, les cellules croient et dupliquent leur ADN. L'interphase se compose de quatre phases, soit G0, G1, S et G2.

- **Phase G0:** C'est la phase de quiescence cellulaire qui représente la plupart des cellules de notre organisme. Lors de ce stade, les cellules dormantes ne reçoivent pas des signaux mitogènes, ce qui baisse leur activité transcriptionnelle de manière dramatique. Il est important de mentionner que cette phase de dormance n'existe pas chez les cellules tumorales (227).
- **Phase G1:** Pendant laquelle les cellules croient et s'engagement de façon irréversible dans le cycle de division en passant par le point de restriction (228). Durant cette phase, les cellules grossissent et synthétisent beaucoup des macromolécules nécessaires pour la réplication de son ADN.
- **Phase S:** Elle correspond à la phase de réplication de l'ADN. Une copie intégrale de l'information génétique doit être transmise de manière identique de la cellule mère aux cellules filles. Toute lésion non réparable dans l'ADN entraîne l'arrêt du cycle et le

déclenchement de l'apoptose. De plus, la phase S c'est la phase de duplication des centrioles (229).

- **Phase G2:** dernière phase de l'interphase, relativement courte et permet à la cellule de vérifier la fidélité de réplication de son ADN et de se préparer à la division mitotique en initiant la condensation de chromosomes (230).

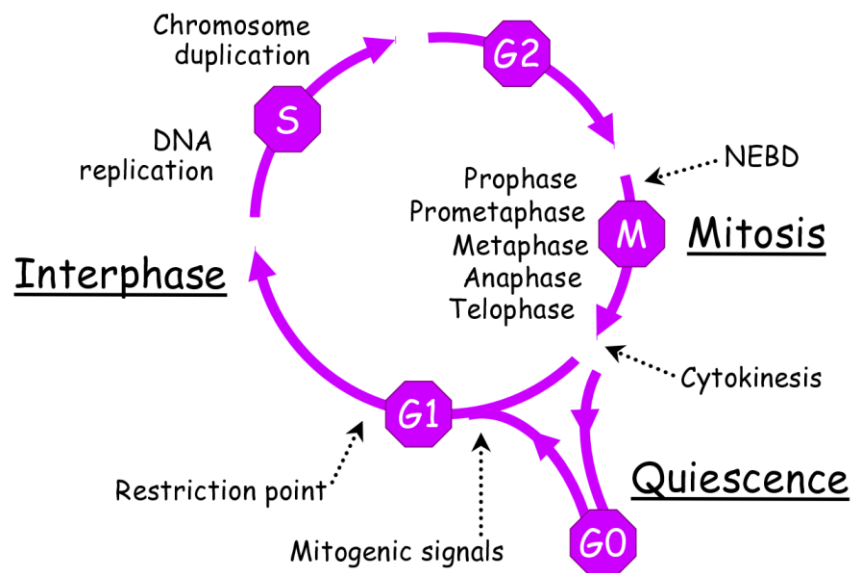


Figure 12. – Représentation schématique du cycle cellulaire des mammifères

Le cycle cellulaire est divisé en deux grandes phases : l'interphase (G0, G1, S, G2) et la Mitose (M). La cellule peut sortir du cycle cellulaire après la phase M ou avant le point de restriction pour rentrer en phase de repos G0 ou appelée aussi phase de quiescence (231).

1.1.2.1.2 Mitose

La phase mitotique est marquée particulièrement par la ségrégation chromosomique et la naissance de deux cellules filles. Elle se déroule en cinq phases définies en fonction de la

morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase/cytokinèse (Figure 13).

- **Prophase:** Correspond à la disparition du nucléole, la rupture de l'enveloppe nucléaire et la condensation des chromosomes. De plus, durant cette première phase mitotique, les microtubules commencent à former le fuseau mitotique entre les deux centrosomes (232).
- **Prométaphase:** La membrane nucléaire est complètement rompue et les centrosomes se placent de part et d'autre des chromosomes condensés. Des filaments du fuseau mitotique s'allongent de chaque pôle pour s'attacher au kinétochore formé sur le centrosome de chaque chromatide. Ce point d'ancrage supportera la force de traction appliquée par les filaments de microtubules pour séparer les deux chromatides sœurs de chaque chromosome. À la fin de cette phase, on peut voir aussi un début d'alignement des chromosomes (233).
- **Métaphase:** Les événements de la métaphase commencent quand les microtubules mitotiques s'arriment aux kinétochores et que tous les chromosomes sont correctement attachés. Cette phase est caractérisée par l'alignement des chromosomes, sous leur forme la plus condensée, à équidistance des pôles pour former la plaque équatoriale. La transition métaphase-anaphase est modulée par un point de contrôle mitotique ou check-point.
- **Anaphase:** durant laquelle, le centromère de chaque chromosome est séparé en deux et les chromatides sœurs s'éloignent simultanément. La migration des chromatides vers le pôle opposé du fuseau mitotique est médiée par les protéines motrices. Les fibres du

fuseau mitotique s'étirent et allongent la cellule qui se prépare pour la prochaine étape de la division.

- **Télophase:** Au cours de laquelle, les chromatides atteignent leur destination polaire et l'enveloppe nucléaire commence à se reformer autour des deux lots de chromosomes qui se décondensent au fur et à mesure. Chaque lot possède une copie complète du génome de la cellule mère. Ensuite, l'étirement commence à séparer physiquement les deux cellules filles.
- **Cytokinèse:** C'est la dernière étape de la mitose et du cycle cellulaire, elle correspond à la séparation physique de deux cellules filles selon un plan de clivage au milieu de la cellule et perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique. Cette séparation est médiée par la contraction d'un anneau formé d'actine et de myosine. Cela se traduit par la formation d'un sillon de division qui devient de plus en plus serrée jusqu'à la séparation totale des deux cellules filles qui se retrouvent en début de la phase G1 (avant le point de restriction) d'un nouveau cycle (234).

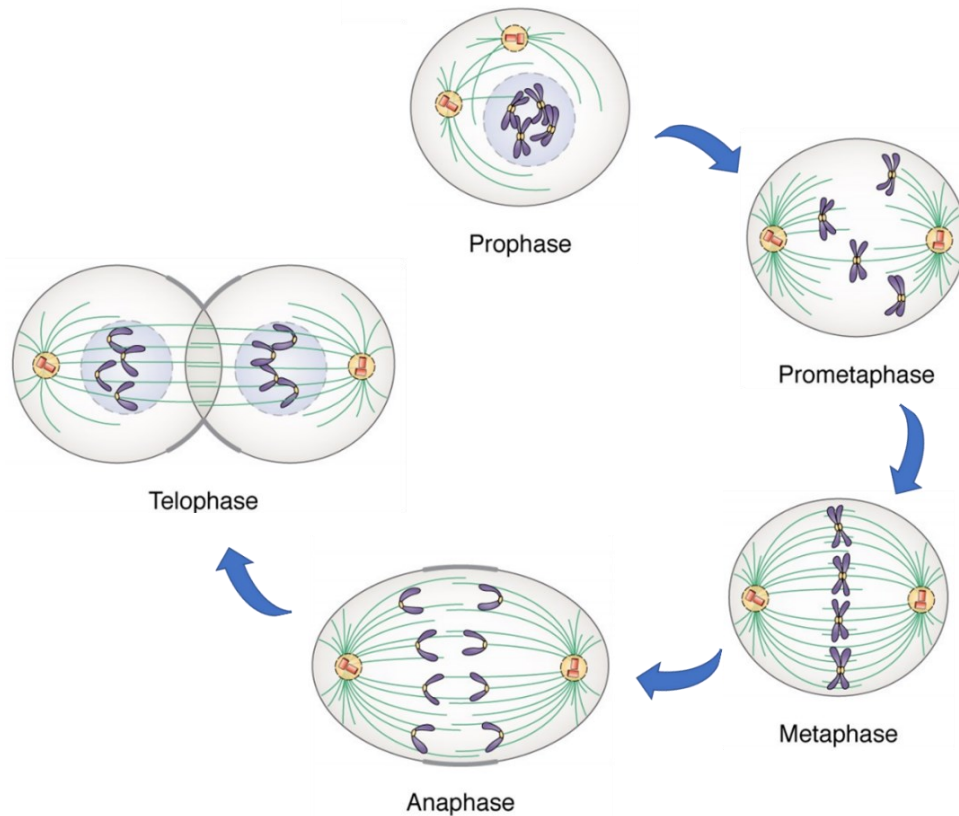


Figure 13. – Les étapes de la mitose

La mitose se déroule en cinq stades selon la condensation des chromosomes et l'intégrité de l'enveloppe nucléaire (prophase, prometaphase, métaphase, anaphase et télophase/cytokinèse). L'ADN et les chromosomes sont présentés en bleu, les microtubules sont en vert, les centrosomes et les kinétochores sont en jaune. Adaptée de (235).

1.1.2.2 Les ARNm dans le cycle cellulaire

La succession des événements morphologiques de différentes phases du cycle cellulaire est hautement contrôlée par des événements moléculaires (236). Ces phases sont intimement liées et dépendantes l'une de l'autre, la phase suivante ne peut être entamée que, si et seulement si, la précédente est adéquatement défilée. Pour contrôler le bon déroulement de ces phases, il existe des points de surveillance d'aspects fondamentaux comme le point de contrôle des dommages à l'ADN ou DDCP « *DNA Damage Checkpoint* », le point de contrôle de l'achèvement total de la réplication

avant l'entrée en mitose ou RCP « *Replication Checkpoint* » ainsi que le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique ou MPC « *Mitotic Checkpoint* ».

L'intérêt majeur de l'étude de la régulation du cycle cellulaire réside dans le fait qu'une défaillance dans ce processus est impliquée dans plusieurs pathologies et conduit souvent à des proliférations anarchiques cancéreuses. Ainsi, approfondir nos connaissances sur la régulation de différentes étapes du cycle cellulaire est donc nécessaire pour mettre en œuvre de nouvelles approches thérapeutiques. Dans cette thèse, on met plus l'accent sur le rôle de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique dans la modulation de la division cellulaire et surtout l'implication de la localisation des ARNm dans ce processus.

Des études génomiques menées par micropuces, RNA-Seq et spectrométrie de masse ont montrés une fluctuation du niveau de l'expression de centaines de protéines durant le cycle cellulaire dont plusieurs sont spécifiquement exprimées en G2 et en M (109, 237-241). En effet, la régulation de l'abondance protéique est cruciale au cours du cycle cellulaire, en particulier à la fin de la mitose lorsqu'un grand nombre de protéines est ubiquitiné par l'ubiquitine ligase E3, le complexe promoteur d'anaphase (APC), puis dégradé par le protéasome (242, 243).

Quant aux ARNm, leur niveau d'expression varie également en fonction des phases du cycle cellulaire (237, 238). D'ailleurs, une étude quantitative du transcriptome menée à grande échelle sur des cellules humaines synchronisées à différents points montre que le profil d'expression de ~1600 transcrits varie dépendamment du cycle dont 120 candidats sont exprimés particulièrement en mitose (109). D'autres travaux de profilage de l'expression génique selon les différentes étapes de la division cellulaire trouvent que 18.6% des gènes sont surexprimés durant la transition G1/S et 19.5% en phase S. Les gènes de chacune de ces phases ont un rôle connu dans l'initiation de la réplication et le métabolisme de l'ADN. En outre, plus de 50% des gènes ont montré

un pic d'expression en G2 et en M; 21.1% en G2, 24,1% en G2/M et 16.8% en M/G1. L'annotation fonctionnelle des gènes exprimés en G2 et M montre un enrichissement des protéines impliquées dans le métabolisme de chromosome, surveillance de la mitose et l'adhésion cellulaire (238).

Comme mentionné précédemment, la localisation et la traduction localisée des ARNm modulent la division cellulaire asymétrique ainsi que le développement embryonnaire chez la drosophile et le xénope. Ce processus joue également un rôle crucial dans le contrôle des protéines clés pour la progression du cycle cellulaire (244). Les protéines kinase dépendantes des cyclines ou CDK « *Cyclin-Dependent Kinase* » contrôlent le passage d'une phase du cycle cellulaire à une autre grâce à la formation d'hétérodimères avec les cyclines (245). La régulation des complexes CDK-cyclines peut se faire de plusieurs façons: l'expression différentielle en fonction du cycle cellulaire, la localisation, la dégradation par les protéasomes et ainsi la phosphorylation des kinases CDK elles-mêmes (246). La transition G1/S de cellules humaines est contrôlée par l'ARNm *Cycline E1*. Ce dernier possède une structure secondaire en 5'UTR qui bloque le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction et empêche la traduction du messenger. Ce blocage disparaît par la linéarisation de la région 5'UTR médiée par l'hélicase DDX3 « *DEAD-box RNA helicase 3* ». La traduction de l'ARNm *Cycline E1* rétablit la progression du cycle cellulaire (247). La transition G1/S implique également la polyadénylation en 3'UTR de certains transcrits par la protéine CPEB « *cytoplasmic-polyadenylation-element-binding protein* », surtout CPEB1 et CPEB4. Ces facteurs modulent l'activation et la répression de la traduction en ajustant la taille de leur queue poly-A (244). Ce phénomène cytoplasmique module d'une manière dépendante du cycle cellulaire la traduction d'une population d'ARNm chez les cellules germinales, fibroblastes et neurones (248). D'ailleurs, dans une étude menée sur des cellules humaines synchronisées à différents points du cycle cellulaire, il a été montré que 349 messagers se trouvent avec une queue

poly-A plus long durant la phase S que lors de la transition G2/M. Contrairement, 222 transcrits étaient davantage plus polyadénylés à la transition G2/M qu'à la phase S. Ces deux groupes d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans la modulation du cycle cellulaire (244).

De plus, la structure de l'ARNm en 5'UTR est importante pour la régulation de la division cellulaire. Des résultats obtenus par profilage ribosomique sur des cellules Hela synchronisées montrent une association différentielle des sous-unités ribosomales à travers les différentes phases du cycle cellulaire. Pendant la phase G1, des transcrits avec une région 5'UTR courte étaient associés à un nombre élevé de polysomes, davantage traduit. Cependant, à la phase S, d'autres messagers avec des régions 5'UTR plus longues se trouvent associés avec moins de polysomes (249). Dans ce sens, une autre étude a montré que 3% des messagers sont associés à des polysomes actifs durant la mitose (241). Cette association compense la répression mitotique du facteur d'initiation de la traduction eIF4E.

La modulation de la stabilité et la traduction de certains messagers contrôlent la transition en mitose. L'ARNm *cycline B* est réprimé par la protéine PUM « *maternal protein pumilio* » de la famille de protéines PUF « *Pumilio and FBF* » avant la phase mitotique. L'activation de la traduction de l'ARNm *cycline B* est cruciale pour l'entrée en mitose, cette traduction est assurée par la kinase PNG (*Pan Gu*) (250). La stabilité de l'ARNm *cycline B* est aussi contrôlée par le complexe HuR qui régule également la stabilité du transcrit *cycline A2* requis pour la transition S/G2 dans les cellules de cancer colorectal RKO (185). Avec le même principe, HuR stabilise les messagers *cycline D1*, *cycline E* et *MMP-9* d'une manière dépendante du cycle cellulaire dans les cellules de cancer du sein MCF7 (251).

1.1.2.3 Localisation des ARNm au niveau de l'appareil mitotique

L'appareil mitotique est composé principalement de centromères, kinétochores et du fuseau mitotique (252). Ce sont des structures cellulaires non membranaires et insolubles. Le centrosome est défini comme le majeur centre organisateur des microtubules ou MTOC « *Microtubule-Organizing Center* » de toutes les cellules animales (253). Il est constitué de deux centrioles disposés perpendiculairement et entourés de matériel péri-centriolaire ou MPC. De plus, le centrosome se duplique en parallèle avec la duplication de l'ADN pendant la phase S. Cet organe module la formation du fuseau mitotique, une structure macromoléculaire très dynamique composée de microtubules, moteurs moléculaires et protéines associées aux microtubules. Ces derniers sont des structures cylindriques de 24 nm de diamètre avec une paroi de 5 nm d'épaisseur constituée essentiellement de l'assemblage d'hétérodimères de tubuline α et β (Figure 14b). Le rôle ultime du fuseau mitotique est d'assurer la ségrégation des chromosomes. Le fuseau se prolonge alors à partir de centrosome de chaque pôle et envahit le centre de la cellule pour s'attacher au point d'ancrage situé au niveau de centromère de chaque chromatide : le kinétochore. Cette interaction dynamique fuseau/kinétochores permet d'aligner les chromosomes métaphasiques au centre de la cellule via le contrôle de la tension du fuseau de chaque côté. En anaphase, la force de traction générée par le fuseau mitotique sur les kinétochores permet de séparer les chromatides sœurs de chaque chromosome (Figure 14a) (233, 254).

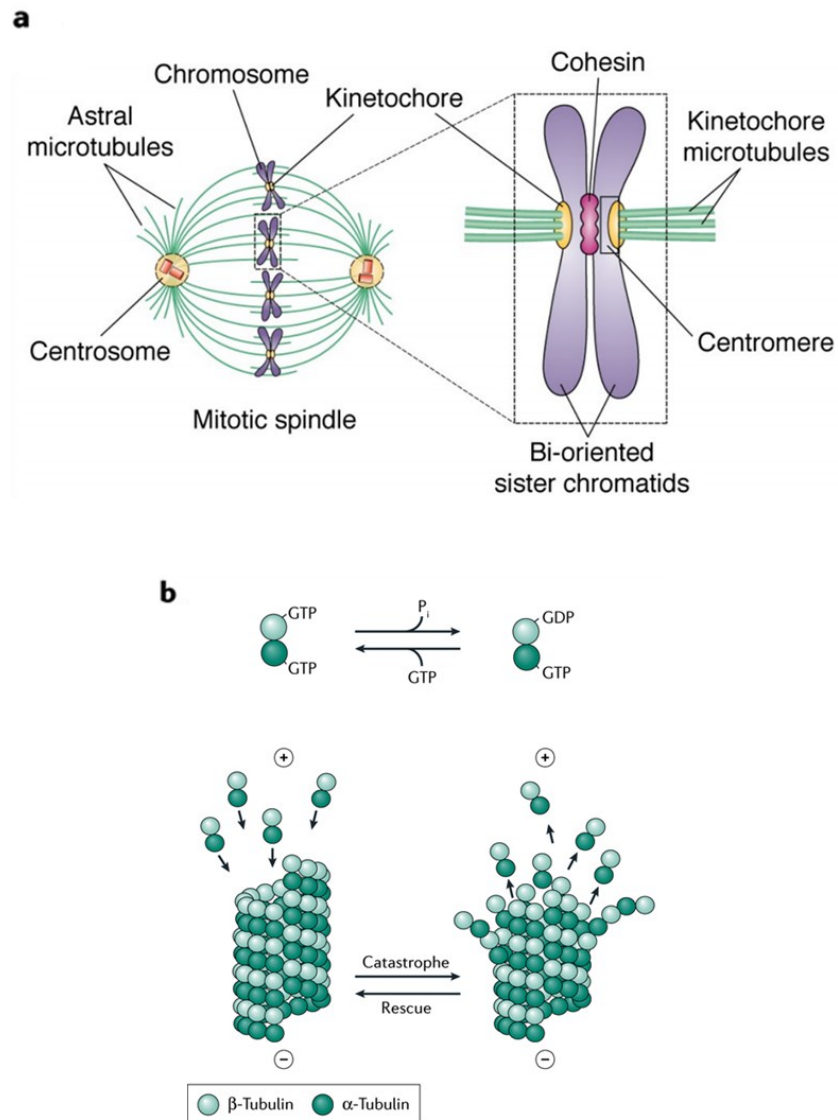


Figure 14. – Composants de l'appareil mitotique et dynamique des microtubules

(a) Illustration schématique des composants de la machinerie mitotique: fuseau mitotique, centrosome, kinétochores, centromères, etc. (b) dynamiques d'assemblage et de désassemblage des microtubules (235, 255).

Au-delà de son rôle de guide pour la ségrégation des chromosomes en métaphase, les composants de la machinerie mitotique constituent eux-mêmes une destination à la localisation des ARNm. Des études sur des organismes modèle ont montré l'enrichissement des ARNm à divers constituants de l'appareil mitotique, principalement les centrosomes, les kinétochores et le fuseau

mitotique. La plupart de ces messagers sont traduits localement et encodent des régulateurs du cycle cellulaire, notamment de la mitose.

Dans l'embryon précoce de xénope, les ARNm *cycline B* et *Bub3* sont enrichis sur le fuseau mitotique et y sont directement traduits. Le transcrit *cycline B* code pour une cycline mitotique régulatrice de CDK, une kinase essentielle pour l'entrée en mitose. La localisation des ARNm *cycline B* et *Bub3* est médiée par les régulateurs CPEB et maskin (256). La traduction locale de l'ARNm *cycline B1* sur le fuseau mitotique est primordiale pour la progression mitotique, puisqu'une mutation dirigée dans le site de fixation de CPEB au niveau de la région 3'UTR du transcrit est suffisante pour faire disparaître l'ARNm *cycline B* ainsi que sa protéine de l'appareil mitotique. Il en résulte l'arrêt de la division cellulaire à la suite de défauts du fuseau mitotique qui rend impossible le plan de clivage (102, 256, 257). De plus, des analyses par immunofluorescence montrent un enrichissement spécifique de cycline B1 sur les kinétochores entre la rupture de l'enveloppe nucléaire et la fin de la mitose (258).

Chez la blastula embryonnaire du poisson-zèbre et les cellules humaines HeLa et RPE1, l'ARNm *PCNT* « *pericentrin* » est enrichi aux extrémités du fuseau mitotique au début de la mitose. Cette localisation est microtubules-dynéine dépendante et requière la présence des polysomes, suggérant une activité traductionnelle. Le centrosome est le centre organisateur majeur des microtubules MTOC. La protéine PCNT est essentielle pour former le matériel péricentriolaire ou MPC, le site de nucléation des microtubules (253). D'ailleurs, l'orthologue de PCNT chez la drosophile, l'ARNm *plp*, est également enrichi au niveau des centrosomes cependant sa traduction localisée n'a pas été étudiée (38).

Chez l'embryon d'escargot « *Ilyanassa obsoleta* È », des transcrits codants pour des protéines impliquées dans le développement embryonnaire, tels *Eve* « *Even-skipped* » *Dpp*

« *Decapentaplegic* » et *Tld* « *Tolloid* » sont enrichis sur la machinerie mitotique afin de faciliter leur distribution asymétrique entre les cellules filles. Cette localisation différentielle des molécules d'ARNm (3 à 4 % de l'ensemble des ARN) peut contribuer à la spécialisation cellulaire lors du développement embryonnaire (256, 259, 260). Ces observations étaient obtenues également chez les embryons de la drosophile, *C. elegans*, xénope et des cellules humaines, suggérant un rôle conservé de la localisation différentielle des ARNm dans la progression du cycle cellulaire (37-39, 253, 261-263).

Des travaux très récents menés sur des cellules humaines montrent la localisation de trois ARNm sur l'appareil mitotique; *HMMR*, *ASPM* et *NUMA1* (112, 253). L'ARNm *HMMR* est concentré sur la région péricentrosomale en présence de polysomes. Ce transcrite encode une protéine connue pour se localiser sur les centrosomes et les microtubules pour exercer son rôle dans l'organisation du fuseau mitotique (264, 265). Cependant, les deux autres ARNm *ASPM* et *NUMA1* codent pour des protéines avec le même profil de distribution et impliquées dans le contrôle de la fonction du fuseau mitotique (266, 267). En mitose, elles sont concentrées au niveau des pôles avec un marquage faible sur le fuseau. Tandis que les ARNm et les protéines d'*ASPM* et *NUMA1* sont enrichis dès la prophase au niveau des centrosomes. La colocalisation des ARNm *HMMR*, *ASPM* et *NUMA1* avec leur protéine en présence d'eIF4E et la protéine ribosomale RPS6 au niveau des extrémités du fuseau mitotique suggère la présence d'une activité de traduction des transcrits localisés (112). En outre, des études biochimiques et microscopiques du fuseau mitotique purifié à partir des ovocytes de xénope et d'oursin de mer ont montré que les polysomes sont étroitement associés aux fractions de microtubules mitotiques, ce qui suggère un rôle potentiel de la traduction localisée dans la régulation de la mitose. De plus, une étude par sonde d'ADN dans des cellules

humaines montre une localisation spécifique de l'ARN ribosomal 18S sur le fuseau mitotique. La délocalisation de ARNr 18S cause des défauts dans structure du fuseau mitotique (268-272).

Des études par micropuces sur des fractions du fuseau mitotique ont montré que 5% (xénope) et 10% (HeLa) des extraits totaux des ARN sont enrichis sur le fuseau mitotique et que seulement une fraction de ces transcrits est associée aux polyribosomes. Ces observations montrent que la traduction locale n'est pas nécessaire pour placer des transcrits sur le fuseau mitotique. L'annotation fonctionnelle des transcrits qui sont associés aux polysomes montre que ces ARNm encodent pour des protéines impliquées dans divers aspects du métabolisme de l'ADN (réplication, réparation, etc.) et de la mitose (39).

Plusieurs types d'ARN sont également enrichis sur le fuseau mitotique, tels que les ARN non codants qui contrôlent des étapes clés de la division cellulaire comme la ségrégation chromosomique, la durée de la phase mitotique et la cytokinèse. En effet, le transcrit *TPPP/p25* « *Tubulin Polymerization Promoting Protein* » est localisé et traduit sur l'appareil mitotique. La protéine TPPP/p25 module la stabilité et la dynamique du fuseau mitotique (273, 274). Le niveau d'expression de *TPPP/p25* est contrôlé par le lncRNA *Linc00889*. La déplétion de *Linc00889* entraîne une surexpression de la protéine TPPP/p25 est cause des altérations dans la dynamique de microtubules et un retard mitotique (181, 275).

En somme, la localisation des ARNm sur le fuseau mitotique est une facette conservée de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. De plus, la traduction des ARNm n'est pas nécessaire pour leur localisation. Ce processus joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire par la localisation des ARNm codants pour des protéines impliquées dans l'assemblage du fuseau et la progression de la mitose. Ce mécanisme est régulé, entre autres, par

les protéines de liaison à ARN qui sont des partenaires associés aux ARNm dans les complexes ribonucléoprotéiques.

1.1.3 Protéine de liaison à l'ARN (RBP)

1.1.3.1 RBP, régulateurs post-transcriptionnels

Les protéines ayant la capacité de se lier directement à l'ARNm ou mRBP font partie d'une large famille de protéines impliquées dans la régulation de toutes les facettes du métabolisme des ARNm. Ce processus de contrôle spatiotemporel de l'expression des gènes représente un phénomène hautement conservé au cours de l'évolution. Il permet chez les mammifères de répondre aux besoins cellulaires et de conserver une homéostasie générale (276).

Dans une interaction ribonucléoprotéique, les deux partenaires peuvent se réguler mutuellement. En effet, la RBP peut interagir avec un ARN pour moduler son métabolisme et ses fonctions (Figure 15a) et l'ARN peut à son tour se fixer sur la RBP pour contrôler son destin et ses fonctions (Figure 15b) (277).

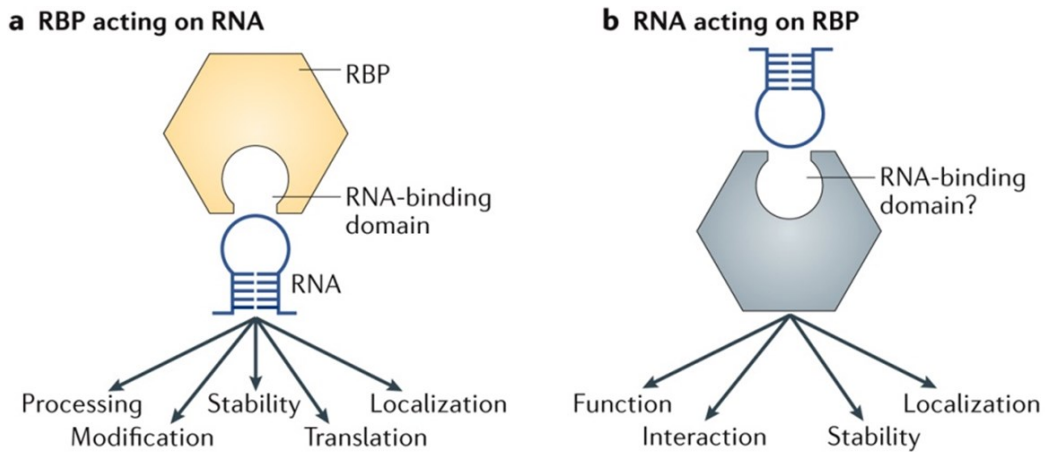


Figure 15. – Interaction fonctionnelle entre RBP et ARN

(a) Une RBP interagit avec un ARN via un RBD afin de réguler son épissage, stabilité, modification, localisation et traduction. (b) Un ARN se fixe sur une RBP pour moduler ses fonctions, ses interactions, sa stabilité et sa localisation. Figure tirée de la référence (277).

Tout au long de leur cycle de vie, les ARNm sont accompagnés par des RBP dans des complexes mRNP. De plus, la composition des mRNP est très dynamique, elle change constamment au cours du cycle de vie de l'ARNm. Dans une même particule de mRNP, on peut trouver plusieurs molécules d'ARNm différentes. Chaque messager est structuré de plusieurs éléments de reconnaissance en cis et pourrait être régulé différemment en fonction du type et de la famille des RBP associées (278).

Par ailleurs, le génome humain contient plus que 1500 gènes distincts codants pour des RBP qui peuvent être classées en fonction de plusieurs critères. La classification de ces protéines selon le type des transcrits cibles montre qu'environ 50% de l'ensemble des ARN recrutés par les RBP sont des ARNm et que 50% englobent tous les autres types d'ARN (tRNA, rRNA, snoRNA, snRNA, ncRNA, etc.) (Figure 16). Ces RBP peuvent se lier aux ARNm via un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARNm ou RBD « *RNA-Binding Domain* » (82, 279, 280).

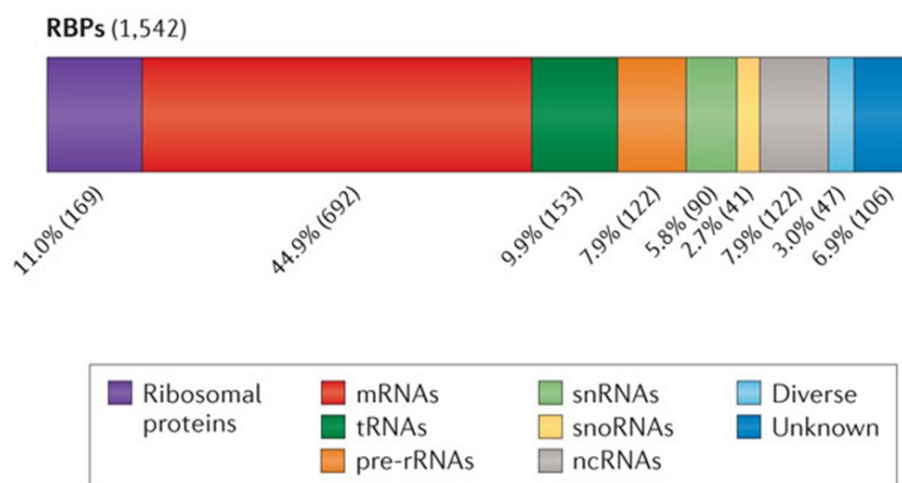


Figure 16. – Types d'ARN cibles des RBP

ARNm, ARNt (ARN de transfert), les pré-ARNr « *preribosomal RNA* », les snRNA « *small nuclear RNA* », les snoRNA « *small nucleolar RNA* », les ncRNA « *non-coding RNA* ». Environ 7% sont inconnues et 3% lient plusieurs types d'ARN. Adaptée de (279).

1.1.3.2 Domaines de liaison à l'ARN

Les RBP peuvent également être classées en fonction de la structure de leurs domaines de liaison à l'ARN: taille de l'élément de reconnaissance de l'ARNm, mode d'interaction avec l'ARNm (double ou simple brin) et l'architecture du motif peptidique. Bien qu'il existe d'autres structures, nous présenterons dans cette section les RBD les mieux caractérisés.

- **Domaine RRM « RNA Recognition Domain »**

C'est le domaine le mieux caractérisé. Il est composé de 80 à 90 acides aminés formant une structure secondaire conservée de deux hélices α et quatre feuillets β organisés comme suit : $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (281). Les feuillets β sont responsables de l'interaction spécifique avec la séquence de l'ARNm dans un contexte de tige boucle (Figure 17a) (280). Dans les cellules humaines, jusqu'à 1% des gènes codent pour des protéines qui contiennent au moins un RRM parmi les 9000 identifiés (282, 283).

- **Domaine KH « hnRNP K-homology »**

Le domaine KH est apte à reconnaître les structures simple-brin aussi bien des transcrits que de l'ADN génomique (284). Le domaine contient environ 70 résidus avec une séquence signature de (I/L/V)-I-G-X-X-G-X-X-(I/L/V) très importante pour le fonctionnement du domaine (Figure 17b). Une mutation dans cette région du gène *Fmr1* qui code pour la protéine FMRP pourrait causer le syndrome de l'X fragile (285). Tous les domaines KH sont constitués de trois hélices α et trois feuillets β . On distingue deux sous-familles du domaine KH selon leur topologie, soit type I de topologie $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ et type II de topologie $\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta$ (286). Les deux sous-classes du domaine reconnaissent un motif de quatre nucléotides GXXG hautement conservé. Contrairement aux domaines PRM « RNA recognition motif » qui impliquent un résidu aromatique dans l'interaction avec l'ARN, le domaine KH nécessite un pont d'hydrogène, une liaison électrostatique et une complémentarité serrure clé avec les motifs sur l'ARN (280).

- **Domaine dsRBD « double-stranded RNA-Binding Domain »**

Le domaine de liaison à l'ARN double-brin ou dsRBD est défini comme une structure variable organisée en hélices α et feuillets β de 70-90 acides aminés très conservés au cours de l'évolution (Figure 17c). Contrairement aux autres domaines capables de lier des séquences spécifiques sur l'ARN, les domaines dsRBD ont la particularité de reconnaître principalement la

structure double-brin mais aussi quelques bases nucléotidiques dans les sillons mineurs de l'ARN. En effet, deux caractéristiques permettent aux protéines qui possèdent des domaines dsRBD de distinguer l'ARN double-brin de l'ADN double-brin (i) la morphologie de l'hélice de type A qu'adopte l'ARN permet de rendre accessible le petit sillon et d'entraver le grand sillon de l'hélice par rapport à celle de type B de l'ADN (ii) la présence d'un groupement OH sur le deuxième carbone du ribose d'une base de l'ARN. La reconnaissance spécifique du squelette ribose-phosphate par le domaine dsRBD remplace en quelque sorte la reconnaissance d'une séquence spécifique (280, 287). De plus, la spécificité de certains dsRBD est médiée, en partie, par une hélice N-terminale qui se lie à des éléments hélicoïdaux irréguliers dans l'ARN de type A tel que les tiges boucles, les mésappariements de base et les renflements (288, 289). En outre, la présence de plusieurs dsRBD peut conférer une spécificité à certaines structures en raison de leur capacité à reconnaître certains arrangements d'hélices d'ARN (290).

- ***Domaine Zinc Fingers « ZnF »***

Les doigts de zinc ou ZnF « *zinc finger* » sont des protéines de liaison à l'ADN qui peuvent également se lier à l'ARN. Ils sont généralement classés en fonction des résidus utilisés pour coordonner l'atome de zinc, on distingue trois familles de doigt de zinc liant l'ARN, soit Cys2His2 (C2H2), CCCH ou CCHC. Les protéines sont composées généralement de répétitions multiples de doigt de zinc (Figure 17c). Par exemple, le facteur de transcription TFIID, où le motif a été identifié pour la première fois, contient neuf ZnF C2H2 dont les doigts 1,2,3,5,7,8 et 9 interagissent avec l'ADN, alors que les doigts 4 et 6 interagissent avec l'ARN 5S (291, 292).

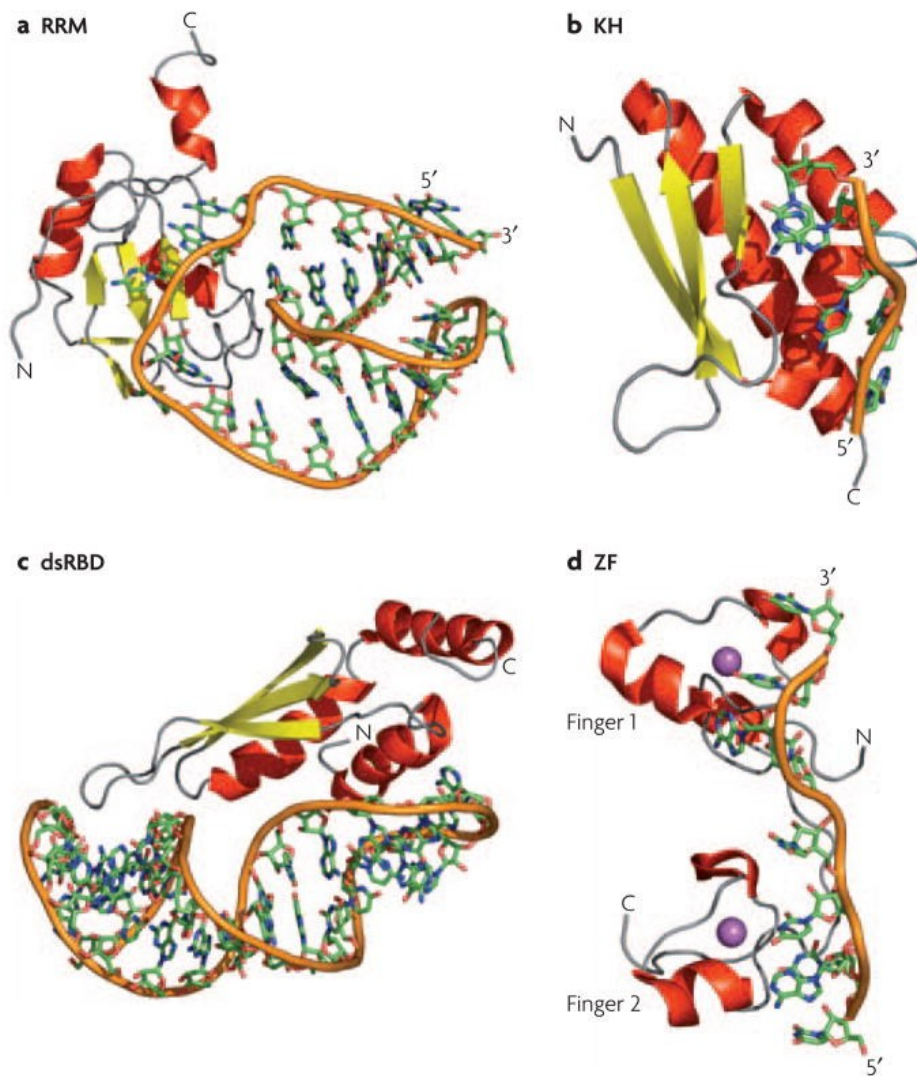


Figure 17. – Exemples de motifs de reconnaissance de l'ARN par les RBP

(a) Structure du motif de reconnaissance d'ARN RRM à l'extrémité N-terminal de l'U1A humain lié à l'ARN18S. (b) Le domaine KH3 de Nova-2 lié à 5'-AUCAC-3', ces domaines se lient à la fois à l'ADN simple brin et à l'ARN par le biais d'une séquence GXXG conservée située dans une boucle exposée (bleu clair). (c) Le domaine de liaison à l'ARN double-brin Rnt1 est lié à un ARN via la séquence AGNN de la tige boucle et interagit avec les groupes 2'-OH dans le petit sillon d'ARN tandis que les résidus Lys et Arg à la fin de l'hélice reconnaissent l'atome de phosphate caractéristique d'une hélice de type A. (d) les deux doigts de zinc de Tis11d sont liés à l'ARE de l'ARN ; l'identité de l'ARN simple brin est reconnue par les liaisons hydrogéniques et l'orientation de chaque base. Dans tous les

panneaux, le squelette ARN est représenté par un ruban orange, les hélices α sont en rouge et les feuilletts β en jaune; l'atome de Zn dans la structure Tis11d est en magenta. Figure tirée de la référence (280).

Il est important de prendre en considération que les RBP ont généralement des structures modulaires constituées d'un ou plusieurs éléments de reconnaissance de l'ARN liés à un ou plusieurs motifs supplémentaires ayant un rôle fonctionnel (p. ex. catalytique) et ce, afin d'augmenter l'affinité de liaison à l'ARN (293). Parmi ces motifs, on trouve la famille des hélicases DExH/DEAD-box, le domaine RS « *Serine/arginine-rich* », la boîte RGG « *glycine-arginine riche box* » et le motif ARM « *Arginine-rich motif* » (294, 295). Cette combinaison variable confère aux RBP un large spectre d'interaction avec l'ADN, l'ARN ainsi que des partenaires protéiques (279).

1.1.3.3 RBP dans le cycle cellulaire

Les travaux de recherche réalisés au cours des deux dernières décennies ont permis d'identifier les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes (296-298). Un criblage à haut débit d'ARN interférents dans des cellules de mammifères d'environ 21000 gènes codants montre que 1249 gènes sont impliqués dans la régulation de la division cellulaire. Parmi ces gènes, 573 transcrits (46%) ont été impliqués dans la régulation de la mitose (299-301).

Plusieurs mRBP jouent un rôle primordial dans la modulation de la division cellulaire. Parmi les mieux connus de ces acteurs post-transcriptionnels on peut citer la protéine HuR qui contrôle le métabolisme de plusieurs ARNm codant pour des protéines clés de la voie MAP kinase, de la progression du cycle cellulaire et la voie de signalisation ATM/CHK2. Parmi les cibles de HuR, on trouve les ARNm *p21*, *MEK2* et *p53* (182, 184, 185, 188). De plus, HuR module la stabilité de l'ARNm *cycline B* qui code à une protéine requise pour la transition G2/M. De plus, la protéine

HuR régule la stabilité du transcrit *cycline A2* requis pour la transition S/G2 dans les cellules de cancer colorectal RKO (185). De même, elle stabilise les messagers *cycline D1*, *cycline E* et *MMP-9* d'une manière dépendante du cycle cellulaire dans les cellules de cancer du sein MCF7 (251).

La SLBP « *Stem-Loop Binding Protein* » est aussi une RBP qui module l'export nucléaire des messagers des histones ainsi que leur traduction durant la phase S. À la fin de la phase G1, SLBP s'associe à la tige boucle au niveau de la région 3'UTR du pré-ARNm des histones pour réguler sa maturation et faciliter sa translocation nucléocytoplasmique. Arrivé dans le cytoplasme durant la phase S, SLBP favorise la traduction des messagers des histones via le recrutement d'eIF4E. Par la suite, elle s'associe avec le facteur UPF1 afin de recruter la machinerie de dégradation des ARNm des histones. La phase S s'achève par la phosphorylation de SLBP par le complexe Cdk1-Cycline A ce qui déclenche sa dégradation par l'E3 ubiquitine ligase SCF « *SKP1-Cull1-Fbox* » (302, 303). Le complexe SCF et APC/C « *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* » joue un rôle primordial dans la modulation du cycle cellulaire. Le complexe SCF est actif durant toutes les phases du cycle cellulaire. Cependant, les ligases APC/C sont stimulées seulement entre la métaphase et la phase G1. Son activation par le cofacteur Cdc20 (APC/c-Cdc20) permet la transition anaphase-télophase, tandis que le complexe APC/c-CDH1 régule la sortie de la mitose (304). Toutefois, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau ou SAC « *Spindle Assembly Checkpoint* » inhibe la transition métaphase anaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes soient alignés et attachés adéquatement aux kinétochores. Ce blocage est médié par la séquestration du cofacteur CDC20 avec les protéines mitotiques MAD2, BubR1 et Bub3 dans le complexe mitotique de régulation ou MCC « *Mitotic Checkpoint Complex* ». Une défaillance dans le fonctionnement de ces points de contrôle SAC et MCC entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes et favorise les aneuploïdies, un phénotype classique des cellules cancéreuses (305, 306).

Ces exemples montrent l'importance des RBP dans la régulation du cycle cellulaire, particulièrement la mitose. Cette observation est supportée par des analyses protéomiques des gènes différentiellement exprimés en mitose dont une sous-population est enrichie sur des structures mitotiques (39, 307, 308).

1.1.3.4 RBP localisée sur le fuseau mitotique

L'analyse par spectrométrie de masse de fractions purifiées du fuseau mitotique extraites des cellules humaines a permis de montrer le cofractionnement de 795 protéines avec les microtubules mitotiques dont 151 sont déjà connues pour leur association avec l'appareil mitotique (309, 310).

Ainsi, la protéine de liaison à l'ARN RITA « *RBP-J interacting and tubulin-associated protein* » est une nouvelle protéine associée aux microtubules ou MAP « *Microtubule Associated Proteins* ». RITA est requise pour le bon déroulement de la mitose. Elle se lie à plusieurs structures de microtubules telles que le fuseau mitotique et les centrosomes pour moduler la dynamique du cytosquelette durant la mitose (311). Des résultats plus récents montrent que la protéine RITA est colocalisée avec la kinase Aurora A et son activateur TPX2 « *Targeting Protein for Xklp2* » au niveau des extrémités du fuseau mitotique (312). La déplétion de RITA augmente l'acétylation de la α -tubuline et réduit la dynamique des microtubules mitotiques. Il en résulte des chromosomes non alignés, des défauts de ségrégation et la multipolarité chez plusieurs types de cellules, tels que les MEF « *Mouse Embryonic Fibroblasts* » (311, 313).

Comme mentionné précédemment, CPEB est impliquée dans la régulation de la localisation et la traduction de l'ARNm *Cyclin B* sur le fuseau mitotique. Les kinases mitotiques, les cyclines et les cyclines-CDK sont des protéines primordiales pour les différentes phases de la division

cellulaire (312). La neutralisation de l'activité de CPEB ou la mutation de l'élément de reconnaissance dans la région 3'UTR du transcrit entraîne des défauts d'assemblage du fuseau mitotique et perturbe le déroulement de la mitose (102).

Récemment, des travaux réalisés sur des cellules de mammifères indiquent que la RBP Gle1 est colocalisée avec l'ARNm *PCNT* au niveau des centrosomes mitotiques. Cette association est nécessaire pour la nucléation des microtubules (314). Dans cette même étude, plusieurs autres RBP sont enrichis aux différents composants de l'appareil mitotique tel RBM14, RBM8A, MAGOH et NDH2. Ces RBP sont associées à leurs ARNm cible.

Une autre protéine liant l'ARN connue pour son rôle multifonctionnel dans le métabolisme des ARNm a été récemment identifiée comme modulateur du cycle cellulaire, c'est la protéine Staufen1 (STAU1) (315, 316). Dans la prochaine section, nous décrirons STAU1 de même que sa distribution subcellulaire et nous discuterons de son implication dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique.

1.2 Staufen1, un effecteur de la régulation post-transcriptionnelle

1.2.1 Description générale et structure

La protéine de liaison à l'ARN double-brin (dsRNA) Staufen a été initialement identifiée chez la drosophile *D. melanogaster*, grâce à un criblage génétique qui avait pour objectif de caractériser les gènes impliqués dans l'ovogenèse et le développement embryonnaire (317, 318). Staufen de la drosophile (dStau) a été conservée au cours de l'évolution. Deux orthologues de cette protéine ont été clonés chez les mammifères ainsi que chez d'autres vertébrés, tels que le poisson-zèbre et le xénope (319, 320).

Chez l'humain, deux paralogues ont été identifiés, soit Staufen1 (STAU1) et Staufen2 (STAU2) (321, 322). L'épissage alternatif du transcrit de STAU1 permet l'expression de trois isoformes protéiques différentes, soit STAU1⁵⁵, STAU1ⁱ et STAU1⁶³. STAU1⁶³ encode une protéine de 577 acides aminés ayant une masse moléculaire de 63 kDa. Cependant, STAU1⁵⁵, qui est le plus exprimé, encode une protéine de 496 acides aminés ayant une masse moléculaire de 55 kDa, alors que STAU1ⁱ ne diffère de STAU1⁵⁵ que par l'insertion de 6 acides aminés dans le domaine dsRBD3 (Figure 18) (321, 323). En ce qui concerne STAU2, l'épissage alternatif engendre quatre isoformes : STAU2⁶², STAU2⁵⁹, STAU2⁵⁶ et STAU2⁵² qui diffèrent au niveau de leurs extrémités (Figure 18) (324-326).

En comparaison avec dStau, qui possède cinq domaines de liaison à l'ARN de type dsRBD, STAU1 et STAU2 ne contiennent que quatre dsRBD consensus (327). STAU1 a conservé les dsRBD correspondant aux domaines 2 à 5 de dStau1, alors que STAU2 a plutôt hérité des quatre premiers dsRBD (323, 324, 328). Tout comme chez la mouche, seuls les dsRBD 1, 3 et 4 ont la capacité de lier l'ARN, le dsRBD 3 étant le domaine ayant la plus forte affinité pour l'ARN (323, 327, 329). La divergence à faire entre dStau et STAU1/STAU2 est la présence dans ces deux paralogues d'un domaine de liaison à la tubuline ou TBD « *Tubuline Binding Domaine* », qui se trouve entre le dsRBD4 et dsRBD5 de STAU1, ainsi qu'en aval du dsRBD4 de STAU2. De plus, les deux protéines contiennent le domaine SSM « *Staufen-Swapping Motif* » responsable de leur homo et hétérodimérisation (323). Malgré l'homologie structurale entre STAU1 et STAU2, les deux protéines ne sont pas toujours impliquées dans les mêmes fonctions biologiques. D'ailleurs, des travaux menés sur des souris ont montré que les deux paralogues ne s'associent pas aux mêmes complexes ribonucléoprotéiques (324). Les résultats rapportés dans cette thèse sont obtenus par des travaux menés sur STAU1.

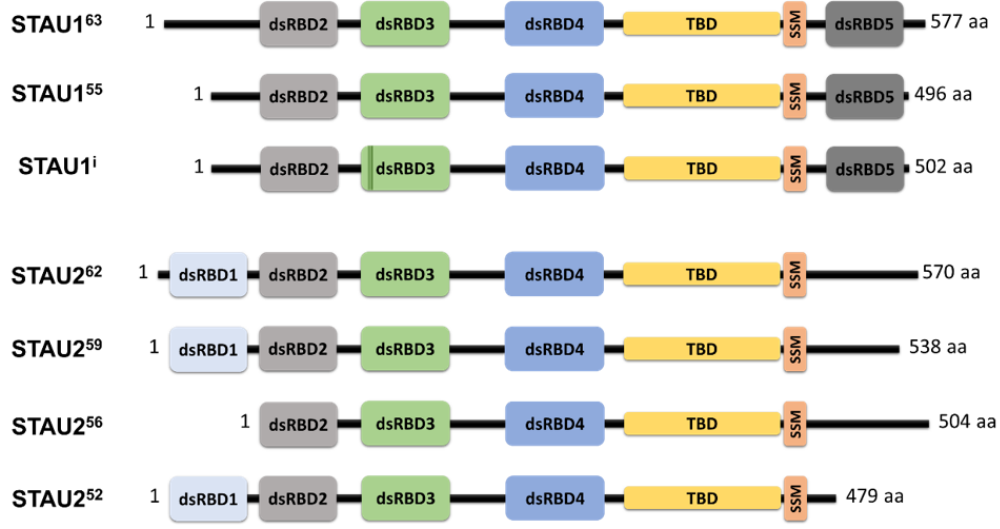


Figure 18. – Isoformes de STAU1 et STAU2 humain

dsRBD: Domaine de liaison à l'ARN double-brin. Le dsRBD ayant la plus forte affinité pour l'ARN est en vert. Les dsRBD incapables de s'associer aux ARN double-brin sont en gris. TBD, en jaune, représente le domaine de liaison à la tubuline. En orange sont présentés les SSM : « *Staufen-Swapping Motifs* ».

1.2.2 Distribution intracellulaire de STAU1

Contrairement à son homologue STAU2 qui est majoritairement exprimée dans le cerveau, STAU1 est exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus et lignées cellulaires. Dans les neurones, la distribution de STAU1 est somatodendritique cependant, sa distribution dans les cellules non polarisées est majoritairement cytoplasmique avec une transition nucléaire. (323, 324, 328, 330). Le passage nucléaire de STAU1 est médié par une séquence de localisation nucléaire ou NLS « *Nuclear Localization Signal* » située à l'extrémité C-terminale de son dsRBD3 (323, 331). Au contraire de STAU2, STAU1 semble indépendant de la voie d'export nucléaire CRM1/exportine-5. D'ailleurs, l'inhibition de la machinerie polymérase I, II et III n'induit pas la

réretention nucléaire de STAU1, car sa navette nucléocytoplasmique ne requiert pas le recrutement des nouveaux transcrits (331).

1.2.3 Association de STAU1 aux divers organites

Son abondance cytoplasmique et sa capacité de lier l'ARN font de STAU1 un facteur actif dans de nombreux complexes ribonucléoprotéiques de transport et de localisation des messagers. Ces mRNP sont souvent associés à des structures cellulaires.

1.2.3.1 Réticulum endoplasmique rugueux (RER)

Des études menées sur les cellules humaines, COS-7 et HeLa, ont montré que STAU1 est enrichi au niveau de la surface périnucléaire. Ce profil de localisation correspond à celui des vésicules du réticulum endoplasmique rugueux (RER). En effet, des études par immunofluorescence montrent que STAU1 colocalise avec les composants du RER, soit la calnexine et la ribophorine1 (323, 328, 332-334).

1.2.3.2 Polyribosomes

Un autre attribut de STAU1 est sa capacité à s'associer aux ribosomes. Plusieurs études ont montré que cette association stabilise les polysomes et empêche la répression des ARNm en cours de traduction (323-325, 335-338). D'ailleurs, l'isoforme STAU1⁵⁵ est enrichi en grande partie dans les fractions de sous-unités ribosomiques (40S et 60S) sur un gradient de saccharose. La cartographie de déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction de STAU1 et son partenaire ribosomique a révélé l'identité d'une région minimale composée du dsRBD4 et du TBD. L'activité de liaison à l'ARN, assuré surtout par le dsRBD3, semble être nécessaire pour optimiser cette

association (335). Ces données montrent que la protéine STAU1 est impliquée, via son interaction avec les ribosomes et les granules du RER, dans la régulation de la traduction de certains ARNm cibles (333).

1.2.3.3 Granules de stress (SG)

Les cellules eucaryotes reprogramment leur métabolisme d'ARNm en réponse au stress. Il s'ensuit une inhibition générale de la traduction et le stockage des messagers dans les SG. Ces dernières contiennent avec les messagers certains composants de la machinerie de traduction avec toutefois la présence des RBP qui accompagnent l'ARNm tout au long de son cycle de vie.

Ainsi, plusieurs études montrent que STAU1 est impliqué dans les granules du transport des ARNm neuronaux du noyau vers les dendrites. Ces études montrent également qu'à la suite d'un stress des oligodendrocytes de rat, ces granules d'ARNm se dissocient et STAU1 se relocalise dans les SG. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'interéchange dynamique entre les différents types de granules d'ARN. Une deuxième étude menée par la même équipe a permis de constater que la déplétion de la protéine STAU1 par le biais de l'ARN interférant facilite la formation des SG et augmente significativement leur nombre dans les cellules. Cependant, la surexpression de STAU1 inhibe l'assemblage des SG, mais protège les polysomes. Lors d'un stress, la survie cellulaire est moins importante dans les cellules qui sont dépourvues de la protéine STAU1 (336).

Enfin, des résultats antérieurs issus de notre équipe de recherche montrent que STAU1 est impliqué dans plusieurs étapes du cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1, incluant la multimérisation des protéines Gag, l'encapsidation et l'assemblage de l'ARN viral (ARNv) (339-342). Dans une récente étude à laquelle j'ai contribué, nous avons observé un déficit dans la capacité du VIH-1 à dissocier les SG dans les cellules STAU1-KO. De plus, la

séquestration de l'ARNv dans les SG entraîne une chute dans sa traduction et une diminution de l'infectivité des particules virales de VIH-1 (343).

1.2.3.4 P-bodies

Les P-bodies « *Processing bodies* » sont des inclusions cytoplasmiques de dégradation d'ARNm. Contrairement aux SG, les P-bodies contiennent des protéines de la machinerie de dégradation d'ARN (157). Dans cette structure, les transcrits ne sont pas associés aux ribosomes et la traduction est réprimée en phase d'initiation (160). Les ARNm séquestrés dans le SG peuvent être transférés aux P-bodies pour le triage avant d'être recyclés « *turnover* » ou dégradés. Le turnover des ARNm est important pour les réponses synaptiques, d'où la présence des P-bodies dans les dendrites (159).

1.2.3.5 Microtubules

Le réseau des microtubules s'étend du noyau à la membrane plasmique et constitue une principale voie de transport empruntée par les organelles et les complexes macromoléculaires sur de longues distances. Ce transport actif implique deux moteurs moléculaires, soit les dynéines et les kinésines (88, 89, 344, 345).

STAU1 est probablement le facteur *trans* le mieux caractérisé pour son association au trafic des ARNm, surtout dans les neurones (346). La localisation subcellulaire de cette protéine concorde parfaitement avec son rôle dans les différentes voies de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique. STAU1 est capable, *in vitro*, de s'associer aux microtubules, et ce, grâce à son domaine de liaison à la tubuline TBD situé entre les dsRBD4 et dsRBD5. Cette caractéristique structurale est nécessaire pour que la protéine STAU1 accomplisse

ses activités de régulations post-transcriptionnelles, particulièrement le transport et la localisation. Toutefois, le domaine TBD seul n'est pas suffisant pour l'association de STAU1 aux microtubules (323).

Plusieurs études ont montré que la protéine STAU1 est enrichie dans des particules mobiles contenant de l'ARNm et associées aux microtubules ainsi qu'aux protéines motrices (88, 324, 325, 328, 330, 347). À titre d'exemple, la protéine STAU1 est impliquée dans le transport de l'ARNm *cycline B1* au pôle animal de l'ovocyte durant l'embryogenèse chez le poisson-zèbre en collaboration avec les microtubules et les kinésines 1 (348). De la même manière, XStau localise des ARNm *Vgl* et *VegT* dans le pôle végétatif des ovocytes de xénope (349). D'ailleurs, dans des cellules dendritiques, la dépolymérisation chimique du réseau de microtubules affecte le transport et la formation des mRNP et inhibe le recrutement de STAU1 au sein de ces complexes (332). De plus, lors des analyses protéomiques menées à grande échelle sur des fractions purifiées des microtubules mitotiques, la protéine STAU1 a été identifiée parmi les composants du fuseau mitotique dans les cellules humaines (350) et les cellules de hamster (351).

1.2.4 Sites de liaison reconnus par STAU1 ou SBS « *Staufen-Binding Sites* »

Comme précédemment mentionnée, la protéine STAU1 est composée de quatre domaines de liaison à l'ARN double-brin. Le dsRBD4 et surtout dsRBD3 sont les deux domaines responsables de l'interaction avec les ARNm cibles (Figure 19).

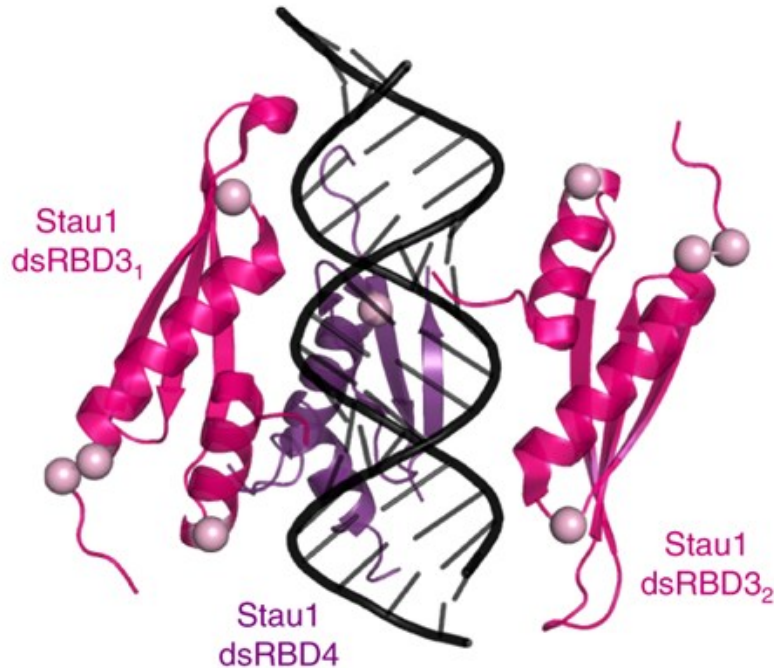


Figure 19. – dsRBD3-4 de STAU1 en complexe avec un ARNm double brin

Analyse de la liaison du dsRBD3 (rose) et dsRBD4 (mauve) d'homodimère STAU1 à l'ARN double-brin (noir) (352).

Ainsi, plusieurs études ont tenté d'identifier les structures des sites de liaison de STAU1 ou SBS « *Staufen-Binding Site* » sur ses transcrits cibles. La première observation de ces études montre qu'environ 75% des séquences reconnues par la protéine STAU1 étaient localisées en 3'UTR des transcrits analysés, environ 20% dans la séquence codante CDS « *Coding DNA Sequence* » et 5% sur la région 5'UTR (333). Il a été montré dans l'une de ces études que les ARNm liés par STAU1 possèdent des régions 3'UTR au moins trois fois plus longue par rapport aux 3'UTR des ARNm non ciblés (353). De plus, il a été montré que la séquence d'interaction avec STAU1 identifiée dans chaque ARNm ne représente pas un consensus pour les autres messagers, mais plutôt une architecture particulière pour chaque transcrit à part.

Une autre étude à grande échelle a été réalisée à partir des cellules humaines a permis d'identifier cinq modèles de sites de liaison de STAU1 classés en deux catégories : intramoléculaires et intermoléculaires.

1.2.4.1 SBS Intramoléculaires

Dans cette catégorie, le site reconnu par STAU1 consiste à un appariement double-brin formé par deux séquences *cis* situées dans la région 3'UTR de la même molécule d'ARN. Environ 96% des duplex liés par STAU1 sont des interactions intramoléculaires (333). Trois types de duplex d'ARN sont possibles dans cette catégorie :

- Duplex sous forme de tige boucle située majoritairement dans la région 3'UTR, mais aussi dans CDS de l'ARN cible (ARNm ou lncRNA). Le lncRNA joue le rôle d'un guide de la protéine STAU1 à l'ARNm cible. (Figure 20 A, B) (333, 354).
- Duplex formé par l'appariement imparfait entre une séquence de type SINE « *Short Interspersed Elements* » ou *Alu* a un nombre variable de répétitions en tandem. Ces éléments *Alu* sont ainsi appelés parce que la plupart d'entre eux contiennent un site unique de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *AluI* (355, 356).
- Site de structure secondaire double-brin formé par l'appariement de deux séquences *Alu* inversées ou *IRAlus* « *Inverted Repeat Alu elements* » situés dans la région 3'UTR (Figure 20 A) (356).

1.2.4.2 Sites intermoléculaires

Cette deuxième catégorie correspond à la formation des duplex d'ARN formé par l'hybridation de deux molécules d'ARN au niveau de leurs extrémités 3'UTR. Cette hybridation

peut se produire entre deux molécules d'ARNm ou également entre une molécule d'ARNm et un lncRNA (Figure 20 C). Les lncRNA jouent le rôle de guide afin de rapprocher les transcrits cibles vers STAU1 pour les stabiliser et favoriser leur traduction (357). (Figure 20 D)

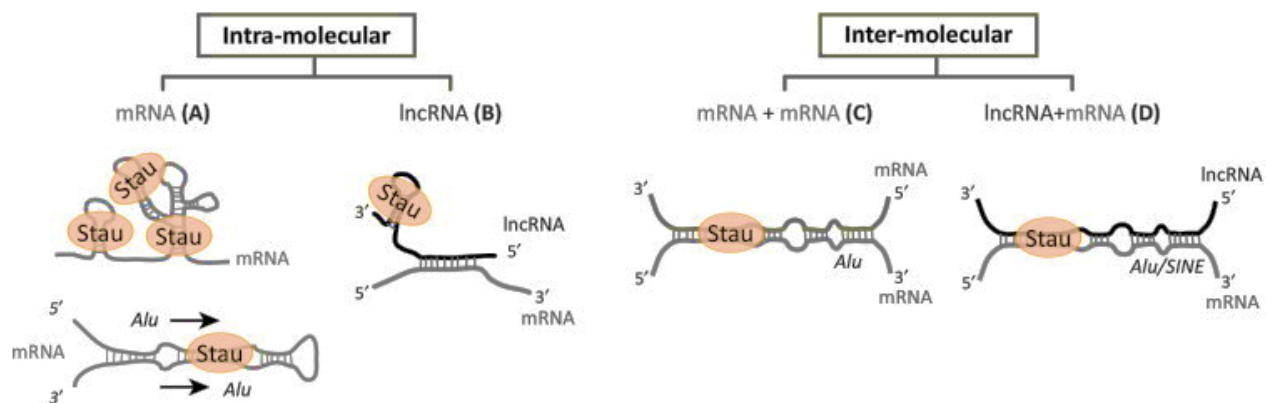


Figure 20. – Illustration des sites de liaison des ARN reconnus par STAU1

(A) Structures intramoléculeaires en 3'UTR de l'ARNm. (B) structure intramoléculeaire en 3'UTR du lncRNA. (C) structure intermoléculeaire en 3'UTR de deux l'ARNm et (D) structure intermoléculeaire en 3'UTR d'un ARNm et un lncRNA. Figure tirée de (358).

Il est intéressant de mentionner que les fonctions de STAU1 dans le métabolisme des ARN dépendent de la structure et l'emplacement de son site de liaison sur les messagers cibles. Quelques exemples sont présentés dans la prochaine section.

1.2.5 Fonctions cellulaires impliquant STAU1

Les caractéristiques structurales de STAU1 font de cette protéine un effecteur post-transcriptionnel multifonctionnel qui contrôle des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la régulation de multiples mécanismes cellulaires et de nombreux processus physiologiques,

notamment le développement neuronal, la différenciation et la prolifération cellulaire, la plasticité synaptique et l'établissement de mémoire à long terme.

1.2.5.1 Épissage alternatif et export nucléaire

Lors de sa transition nucléaire, STAU1 s'associe à des pré-ARNm spécifiques. Cette notion de reconnaissance nucléaire suggère l'implication de la protéine dans des événements de préexportation. En effet, il a été rapporté que les transcrits contenant des *IRAlu* dans leur région 3'UTR forment des agrégats d'ARN ce qui entraîne leur rétention nucléaire. Pour son exportation nucléaire, les molécules d'ARNm doivent subir une polyadénylation alternative afin d'écarter les séquences *IRAlu*. En effet, il a été montré que STAU1 inhibe la rétention nucléaire des ARNm-*IRAlu* et augmente leur translocation nucléocytoplasmique (356).

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie musculaire causée par l'agrégation et la rétention nucléaire du transcrit de la DMPK « *Dystrophia Myotonica protein kinase* ». Ce dernier contient une séquence répétitive CUG à l'extrémité 3'UTR (359). Les cellules touchées par la DM1 manifestent des aberrations dans l'épissage alternatif des pré-ARNm codants pour le récepteur de l'insuline IR « *Insulin Receptor* » et pour le canal chlorure (ClC-1) (360). Les symptômes de cette maladie musculaire sont controversés à la suite de la surexpression de STAU1 qui rétablit l'épissage de l'IR et du ClC-1. De plus, elle favorise l'export nucléaire de la DMPK ainsi que sa traduction cytoplasmique (359, 360). Dans le même ordre d'idée, il a été observé que lors de son passage nucléaire, STAU1 s'associe à l'ARN non-codant de la télomérase (hTR) afin de moduler sa translocation nucléocytoplasmique (338, 361, 362).

En somme, au-delà des fonctions cytoplasmiques, STAU1 montre une implication nucléaire dans le métabolisme des pré-ARNm, tels que la restauration de défauts d'épissage et l'inhibition de la rétention nucléaire des ARNm impliquées dans des aberrations pathologiques (356, 359).

1.2.5.2 Développement embryonnaire et différenciation cellulaire

Pendant le développement embryonnaire chez les drosophiles, dStau est nécessaire pour le transport et la localisation de certains transcrits lors de l'ovogenèse, tels ARNm *bicoid*, *nanos* et *oskar*. La distribution asymétrique de ces ARNm contrôle l'établissement des axes antéro-postérieurs et dorso-ventraux (317, 329, 363, 364). Dans les neuroblastes, STAU1 participe également à la distribution asymétrique du messenger *prospero*. Ceci contribue à l'expression localisée de déterminants morphogénétiques et contrôle la différenciation cellulaire (365). La déplétion de dStau est sans conséquence pour la mouche mère, mais affecte le développement embryonnaire chez sa progéniture, qui finit par mourir avant d'arriver au stade adulte (318, 366). Il a été également proposé que la protéine STAU1 est nécessaire pour la différenciation de cellules embryonnaires souches de la souris (367). De plus, il a été observé que l'efficacité du SMD est favorisée au détriment du NMD lors de la différenciation de myoblastes C2C12 en myotube (368). Contrairement à la mouche, la déplétion de STAU1 chez la souris cause un déficit au niveau de la faculté locomotive (369).

Chez le xénope, l'association de XStau1 aux ARNm *Vgl* et *VegT* module leur localisation tardive au pôle végétatif de l'ovocyte (349). Les deux transcrits codent respectivement pour un facteur de croissance et un facteur de transcription et sont impliqués dans la spécification du mésoderme et de l'endoderme (370, 371). De même, lors de l'ovogenèse du poisson-zèbre, l'ARNm *cycline B1* est livré par Staufen1 au pôle animal. Le transport et la localisation des ARNm

susmentionnés sont assurés par STAU1 grâce à la protéine motrice, kinésine 1, via le réseau de microtubules (348).

1.2.5.3 Plasticité synaptique

Tout comme chez la drosophile, le xénope et le poisson-zèbre, STAU1 de mammifères est impliquée également dans plusieurs fonctions physiologiques via le transport et la localisation de plusieurs ARNm. Ce phénomène avait été bien caractérisé surtout dans les cellules polarisées, telles que les neurones où le transport et la traduction locale des ARNm sont d'importances capitales pour le développement et la croissance des axones et dendrites (372-375).

Des études par immunofluorescence ont permis de montrer que STAU1 joue un rôle clé dans la maturation et la plasticité de la jonction neuromusculaire chez la souris (376). Le transport dendritique de l'ARNm neuronal *CamKII α* « *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha* » est assuré par deux facteurs *trans*, soit STAU1 et CPEB. La déplétion de STAU1 entraîne une diminution de la localisation de cet ARNm. Cette observation a été confirmée dans une souris transgénique par l'expression de l'ARNm *CamKII α* mutée dans sa région 3'UTR pour qu'elle ne soit pas capable de lier STAU1. Les résultats obtenus montrent une chute dans la synthèse de la protéine *CamKII α* au niveau de la densité postsynaptique ou PSD « *Postsynaptic Density* » et une réduction de la phase tardive de la potentialisation à long terme ou LTP « *Long-Term Potentiation* » (377). La localisation synaptique du *CamKII α* par STAU1 semble primordiale pour la plasticité synaptique et la consolidation de la mémoire (88). D'ailleurs, plusieurs autres études ont montré que la régulation à la baisse de STAU1 dans les cellules neuronales provoque des défauts de plasticité synaptique, de mémoire à long terme, ainsi que des malformations des épines dendritiques (369, 375, 376). STAU1 a été aussi impliqué dans le transport d'autres ARNm

requis dans le développement et la maturation neuronale, tels l'ARNm *Map2* « *Microtubule-Associated Protein 2* » (347), l'ARNm *BCI*, β -actine (325). Toutes ces études montrent que STAU1 est impliqué dans le transport et la localisation de certains ARNm spécifiques codant pour des facteurs impliqués dans divers processus physiologiques, notamment le développement neuronal, la différenciation cellulaire, la plasticité synaptique et l'établissement de mémoire à long terme.

1.2.5.4 Activation et répression de la traduction

La cellule module avec beaucoup de précision l'intervalle spatiotemporel de l'expression protéique. Elle peut préférentiellement activer ou réprimer la synthèse d'une protéine en fonction de ses besoins. En effet, lors du transport cellulaire des ARNm, la traduction se doit d'être réprimée, et ce, pour minimiser les erreurs spontanées de synthèse protéique (378). Plusieurs RBP agissent en tant qu'activateur/répresseur traductionnel par l'interaction avec des structures spécifiques de l'ARNm et la modulation du recrutement de la machinerie traductionnelle.

Plusieurs résultats publiés par notre laboratoire montrent l'implication de STAU1 dans la répression et la dérpression des messagers. Ce mécanisme de contrôle de la traduction a été découvert pour la première fois chez la drosophile. Dans la mouche transgénique *Staufen^{-/-}*, l'expression d'un mutant dStau1 tronqué en 5'UTR (Δ RBD5) est capable de reproduire l'effet de l'endogène et rétablir la localisation de l'ARNm *oskar* au pôle postérieur. Cependant, la synthèse protéique n'a été jamais activée par l'expression de ce mutant exogène. En effet, il a été montré que *Staufen1* est impliqué dans l'activation de la traduction en favorisant le recrutement des polysomes (379).

D'autres études réalisées à partir des cellules humaines ont montré que STAU1 est impliqué dans la répression traductionnelle des ARNm, tout comme ses partenaires protéiques tels que les RBP hnRNP-A2, ZBP1 et FMRP (150, 380-383). Ainsi, la répression de l'activité traductionnelle des ARNm est possible via plusieurs mécanismes. Certains messagers peuvent être réprimés via un phénomène d'interférence par microARN médié par le recrutement du complexe RISC « *RNA-induced silencing complex* » (178, 384). La fonction de ce complexe est déterminée par les protéines catalytiques d'argonautes, ainsi que par le pourcentage d'appariement entre l'ARNm et le miRNA, soit la répression ou la dégradation du transcrit (385, 386). Chez la drosophile, dStau se colocalise avec les protéines Argonautes, suggérant une collaboration dans la répression de la traduction via ce mécanisme d'ARN interfèrent.

De plus, lors de transport des granules d'ARNm, ces derniers sont réprimés en phase d'élongation de la synthèse protéique. Cependant, les transcrits qui sont acheminés dans les particules de transport sont réprimés en phase d'initiation de la traduction, ces particules ne contiennent pas des composants de la machinerie traductionnelle (150). La localisation dendritique des ARNm représente un exemple typique de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. En effet, les ARNm *CaMKII α* et *Map2* « *microtubule-associated protein 2* » sont transportés par STAU1 le long des dendrites via le réseau de microtubules dans un état de dormance (328, 387, 388). Arrivés à destination, les ARNm réprimés sont ancrés sur place par les cytosquelettes d'actines jusqu'à une traduction subséquente. La levée de la répression est généralement déclenchée par la phosphorylation des facteurs répresseurs des ARNm. Cette modification post-traductionnelle entraîne le relargage des ARNm localisés de leurs sites d'ancrage et l'activation de la traduction (65, 150, 389, 390). En revanche, la répression traductionnelle est favorisée par la déadénylation de l'ARNm.

Dans une étude similaire menée chez des cellules humaines, l'élément de réponse transactivateur TAR du VIH-1 « *HIV Trans-Activation Response* » a été cloné à l'extrémité 5'UTR d'un ARN reporteur. La structure tige-boucle de l'élément TAR est connue pour sa capacité de recruter des facteurs inhibiteurs de la traduction, mais il est décrit également comme un site de reconnaissance par la protéine STAU1. Les résultats obtenus de cette étude montrent que la surexpression de STAU1 favorise l'expression du rapporteur TAR-luciférase sans affecter la traduction globale de la cellule. De même, une augmentation de la traduction a été observée par l'insertion du site de liaison de STAU1 SBS de la région 3'UTR de l'ARNm *ARF1* « *ADP-Ribosylation Factor 1* » à l'extrémité 5' de l'ARNm rapporteur (379).

Comme précédemment mentionné, STAU1 interagit avec les éléments *IRAlu* présents dans les régions 3'UTR de certains messagers afin d'inhiber leur séquestration nucléaire et favoriser leur translocation dans le cytoplasme. De plus, il a été montré que STAU1 augmente la traduction de ces ARNm une fois dans le cytoplasmique via l'inhibition de leur interaction avec la protéine kinase R ou PKR. Cette kinase est responsable de la répression de la traduction globale dans la cellule via la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α (356).

En conclusion, la majorité des duplex d'ARN sont situés dans les extrémités 3'UTR, comparativement aux duplex identifiés dans la CDS et dans la région 5'UTR. Des duplex de plus que 500 nucléotides ont été identifiés dans l'extrémité 3'UTR et qui peuvent s'hybrider à des éléments proches de la région poly-A (Figure 21). L'annotation fonctionnelle (GO) des transcrits avec des duplex 3'UTR montre un enrichissement dans le trafic protéique suggérant une implication dans la voie sécrétoire et une traduction localisée au niveau du RER. En revanche, les messagers avec des duplex situés dans les CDS sont enrichis pour des protéines impliquées dans la régulation de la mitose (333). Enfin, l'association de STAU1 avec la lncRNA stabilise les

messagers cibles. Comme dans l'exemple de la lncRNA *TINCR* qui achemine STAU1 vers les ARNm cibles et reste attaché aux complexes pour stabiliser les messagers et favoriser leur traduction. Ce mécanisme est facilité par la capacité de STAU1 à lier les polysomes (354, 357).

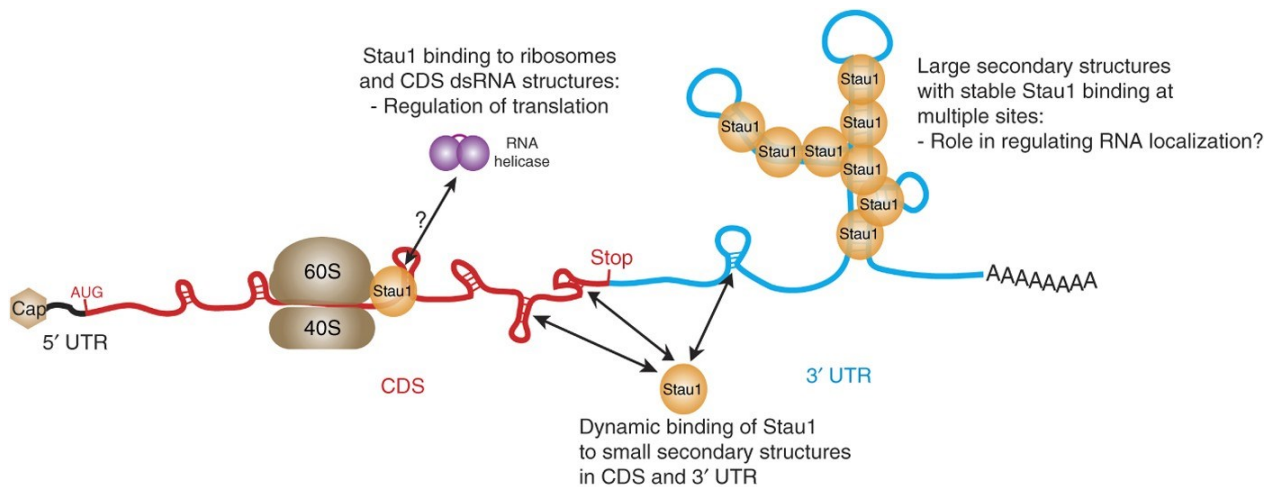


Figure 21. – Modèle de liaison de STAU1 à l'ARNm et son action

STAU1 interagit simultanément avec des polyribosomes actifs et des structures secondaires situés principalement dans les régions CDS et 3'UTR. Des extrémités 3'UTR peuvent contenir des structures complexes formées par des répétitions *IRAlu* qui servent à stabiliser les sites de liaison de STAU1. Cependant, STAU1 interagit aussi avec des duplex situés entre les deux régions CDS et 3'UTR riches en GC. Figure tirée de (355).

1.2.5.5 SMD « Staufen-Mediated Decay »

Bien que STAU1 est décrit comme étant un stabilisateur des transcrits et activateur de leur traduction, il a été également listé parmi les facteurs promouvant la dégradation des ARNm. STAU1 est impliqué dans le SMD « *Staufen-Mediated Decay* » qui consiste en un processus de modulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (391-394).

La voie SMD est déclenchée par la liaison de STAU1 au SBS de l'ARNm et la phosphorylation de son partenaire, l'hélicase UPF1. De plus, le modèle SMD suggère que le facteur

UPF2 agit comme intermédiaire d'interaction entre STAU1 et UPF1 sur le SBS de l'ARNm cible. La dégradation de l'ARNm est amorcée par l'activation de l'hélicase UPF1 par son interaction directe avec le SBS (Figure 22) (352). L'efficacité de ce mécanisme dépend principalement de la capacité de STAU1 à lier des séquences consensus situées en aval d'un codon de terminaison à l'extrémité 3'UTR, de la traduction et de la capacité de recruter l'hélicase UPF1 (368, 391, 393). Contrairement au mécanisme de dégradation NMD, le SMD n'implique pas les facteurs UPF3 ni le complexe exon-jonction (EJC). De plus, la voie SMD ne dépend pas d'un codon-stop prématuré. Toutefois, les deux voies dépendent du niveau de la traduction des ARNm (391). Ainsi, la déplétion de STAU1 entraîne une augmentation de 1.1 % des ARNm totaux dans les cellules humaines (HEK293 et HeLa) (368).

L'ARNm *ARF1* constitue l'exemple le plus étudié pour déterminer la structure secondaire du site d'association de STAU1. Il fut montré que cet ARNm est plus stable en absence de STAU1 (379). La protéine STAU1 cible des structures particulières dans les ARNm et qui sont placées majoritairement en 3'UTR. Le SBS peut être une structure à tige-boucle ou des séquences *Alu* formées entre les régions 3'UTR de deux ARNm comme présentés dans la section (1.2.4).

La voie SMD est impliquée dans plusieurs processus physiologiques, tels que la différenciation cellulaire de myoblastes C2C12 en myotubes (368, 395) la myogenèse et la différenciation myogénique (376, 395), l'adipogenèse (396) et régulation de l'angiogenèse du gliome (397). Ces exemples montrent que la voie SMD régule plusieurs processus et illustre l'importance de STAU1 dans l'homéostasie cellulaire.

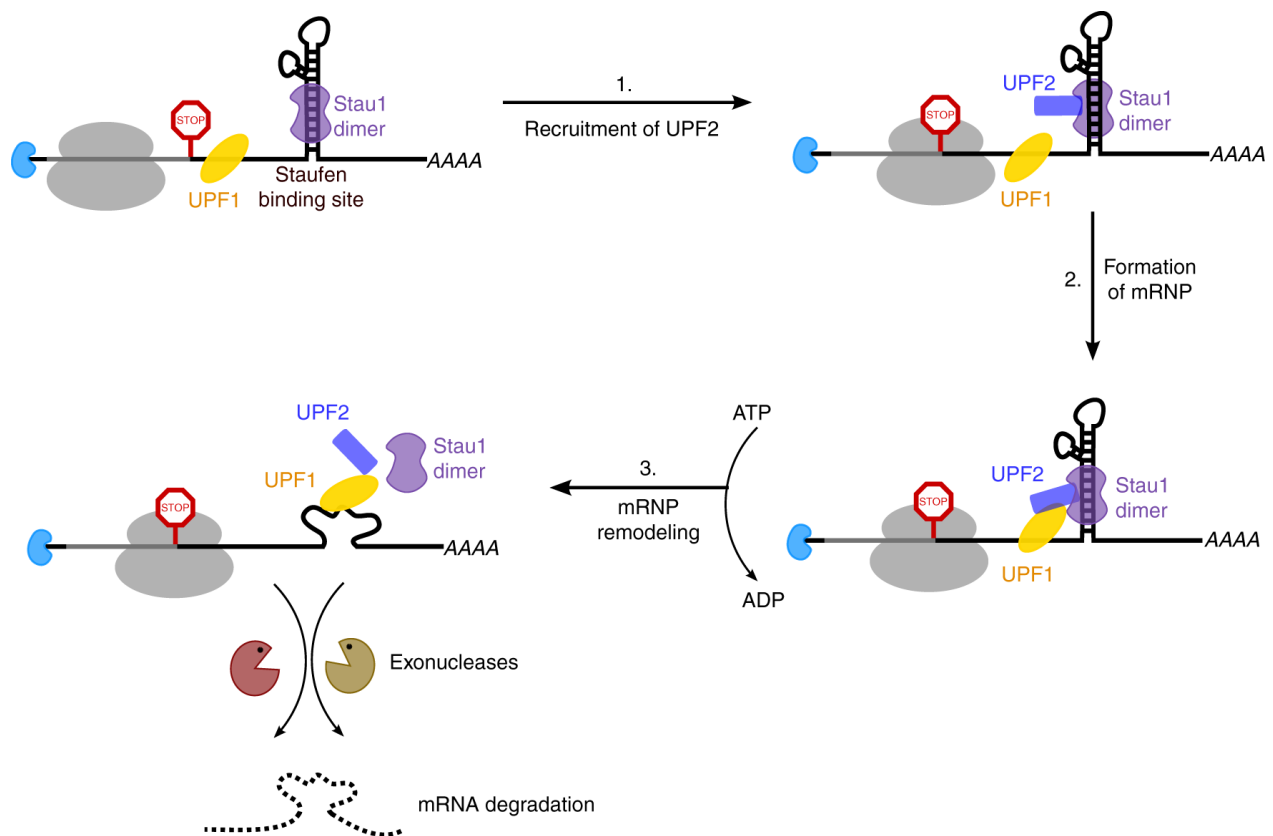


Figure 22. – Modèle pour le mécanisme de SMD

Étape 1: STAU1 s'associe à l'ARNm traduit à un SBS dans la région 3'UTR. Étape 2: UPF2 recrute le facteur hélicase UPF1 sur le site SBS. Étape 3: Remodelage de l'ARNm cible puis la dégradation de l'ARNm. Figure tirée de (352).

1.2.5.6 Prolifération cellulaire

Des résultats publiés récemment par notre laboratoire montrent que le niveau de STAU1 fluctue au cours du cycle cellulaire. En effet, son expression est augmentée en prométaphase, puis diminue en sortie de mitose, lorsque la protéine est polyubiquitinée par APC/C^{Cdc20} et APC/C^{Cdh1} avant d'être dégradée par les protéasomes. Cette fluctuation du niveau d'expression de STAU1 laisse présager que STAU1 est impliqué dans la progression de différentes phases du cycle

cellulaire. De plus, STAU1 s'associe à de nombreux ARNm en prométaphase. Ces messagers codent pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (315, 316, 333, 336, 355, 398, 399).

Ainsi, la surexpression de STAU1 dans des cellules cancéreuses perturbe la progression de la mitose et inhibe la prolifération cellulaire, mais elle n'a pas d'effet sur les cellules non transformées (315, 400). En effet, les types et l'importance des aberrations causées par la modulation du niveau de STAU1 dépendent des contextes cellulaires. Dans le même ordre d'idée, notre laboratoire a récemment montré que STAU1 est susceptible de jouer un rôle important dans la prolifération des cellules non transformées. Récemment, notre équipe de recherche a montré que la déplétion de STAU1 dans les cellules hTERT-RPE1 et les fibroblastes de poumons IMR90 altère la progression mitotique (316). D'autres observations ont permis d'établir que STAU1 est impliquée dans la modulation de l'apoptose induite par le stress hypoxique ou le stress du réticulum endoplasmique (401, 402).

Le modèle proposé par notre laboratoire suggère que STAU1 est un régulon post-transcriptionnel des ARNm codants, entre autres, pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, tel le facteur de transcription E2F1 « *E2 promoter binding factor 1* » (315, 316). De plus, E2F1 est un facteur clé pour la transition G1/S et la prolifération cellulaire (403). Le niveau d'expression du facteur E2F1 est augmenté par la liaison de l'ARNm à la protéine STAU1. À son tour, le facteur de transcription E2F1 se fixe sur le promoteur du gène *STAU1* pour induire son expression (Figure 23) (316). Le facteur de transcription E2F1 est abondant à la fin de la transition G1/S, la phase durant laquelle s'amorce la transcription des gènes requis pour la réplication de l'ADN, la réparation des lésions et la mitose. De plus, E2F1 est impliqué dans

l'expression des gènes requis pour la transition G2/M via l'activation de leurs facteurs de transcription tels que c-MYC et MYB (404, 405).

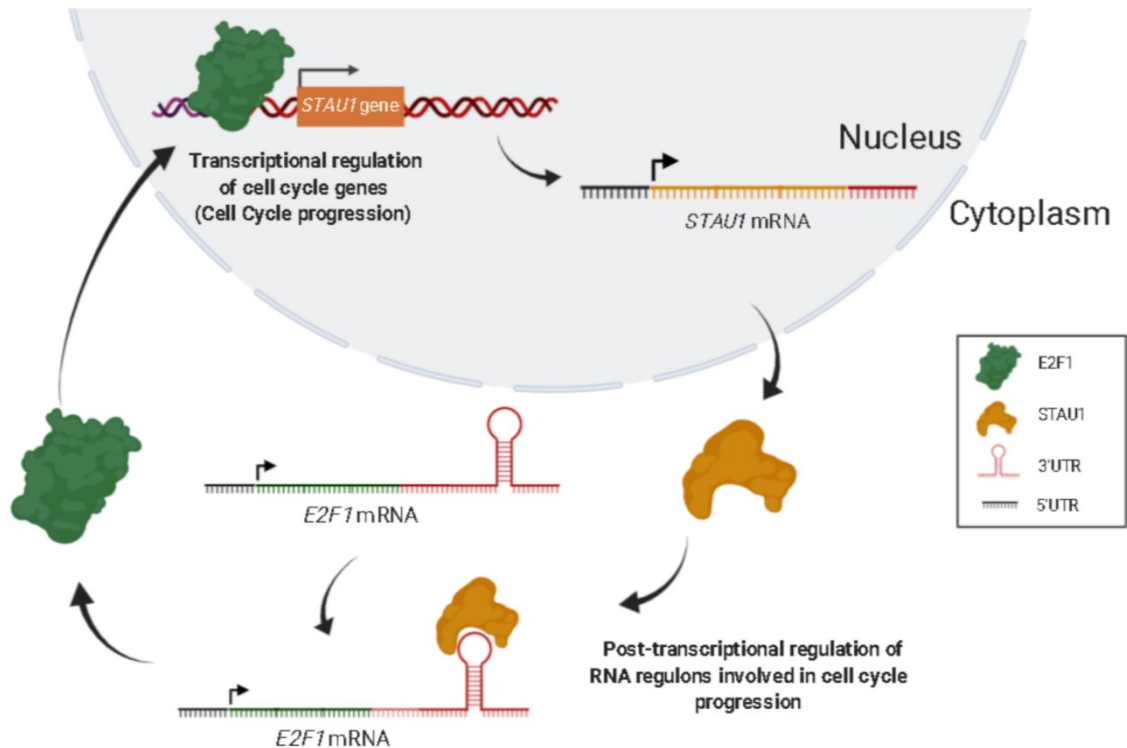


Figure 23. – Modèle de régulation du cycle cellulaire par STAUI et E2F1

STAUI se fixe sur la région 3'UTR de l'ARNm *E2F1* pour favoriser sa traduction. E2F1, quant à lui, se fixe sur le promoteur du gène *STAUI* et induit sa transcription (316).

1.2.5.7 Progression tumorale

L'altération de certaines fonctions de STAUI agit dans quelques cas en faveur des voies tumorales. Dans le cas du cancer de l'estomac par exemple, le facteur de transcription E2F1 induit la surexpression des lncRNA *TINCR* ou *HOXA11-AS* qui se fixent sur STAUI et altèrent le mécanisme SMD. Ce dernier est utilisé par les voies tumorales E2F1/HOXA11-AS et E2F1/TINCR pour dégrader les ARNm codants pour des inhibiteurs du cycle cellulaire

(CDKN21A, CDKN2B et KLF2) afin de favoriser la survie des cellules cancéreuses (406-408). Cependant, dans les cellules de cancer colorectal, le lncRNA *SNHG5* entre en compétition avec STAU1 afin d'empêcher la voie SMD de dégrader les ARNm anti-apoptotiques et ainsi promouvoir la survie des cellules tumorales (409).

Des travaux récents rapportent que STAU1 est impliqué également dans l'angiogenèse tumorale et la migration cellulaire. En effet, la protéine ANKHD1 est une RBP impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et la transcription. Elle est régulée à la hausse dans les GEC « *Glioma-associated Endothelial Cells* » ainsi que dans plusieurs autres cellules tumorales, tels le myélome et la leucémie aiguë. ANKHD1 induit l'angiogenèse et augmente le nombre des cellules migratoires des GEC via la stabilisation du lncRNA *LINC00346*. Ce dernier est surexprimé dans les GEC et favorise la prolifération, la migration cellulaire et la formation du tube capillaire par des cellules endothéliales. Ces effets sont induits par deux protéines, EGFL7 et ROBO4. Ces dernières sont contrôlées négativement par la protéine ZNF655 dans les cellules normales. Dans les GEC, le lncRNA *LINC00346* se combine avec STAU1 et recrute l'ARNm *ZNF655* par son SBS pour être dégradé par SMD afin d'accélérer la dissémination métastatique des GEC (Figure 24) (397).

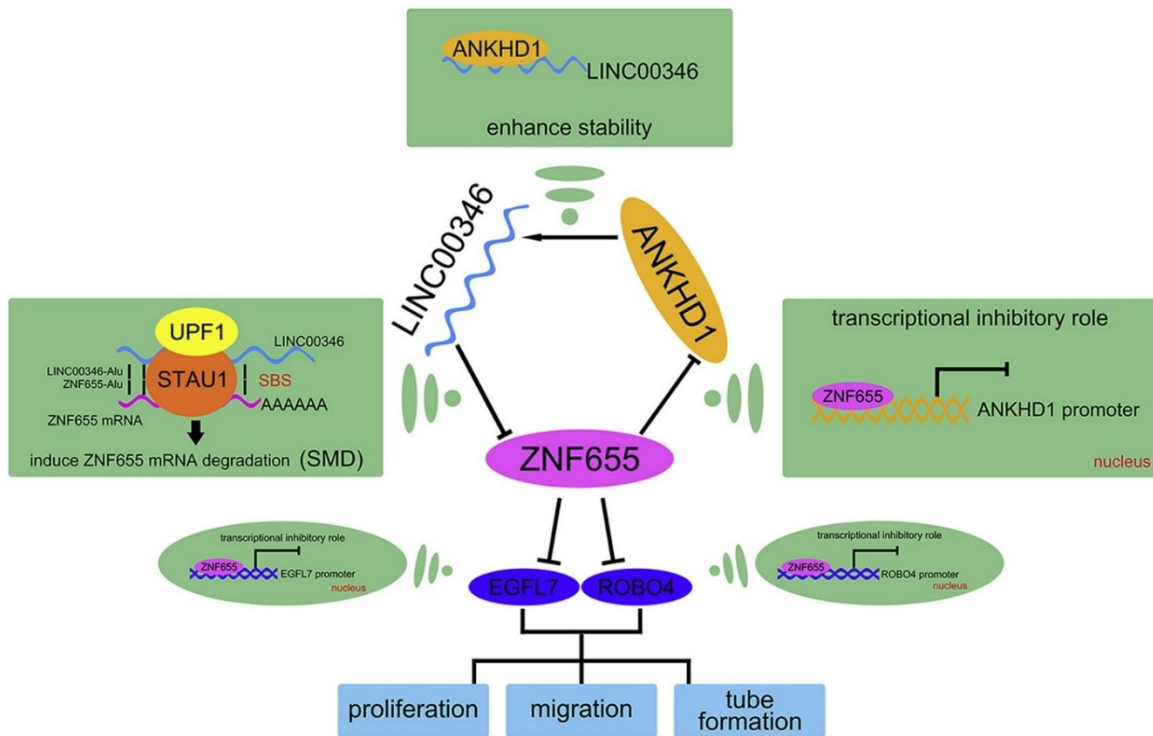


Figure 24. – Schéma résume le rôle du SMD dans la progression tumorale

Dans le glioblastome, le lncRNA *LINC00346* s'associe à la protéine STAU1 qui recrute UPF1 et induit la dégradation de l'ARNm *ZNF655* via le mécanisme SMD (397).

Ensemble, les preuves décrivant STAU1 comme un régulateur post-transcriptionnel des ARNm codants pour des facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhésion et l'invasion cellulaire ainsi que la progression tumorale ne cessent de s'accumuler (401, 402, 406-410).

1.3 Hypothèse et objectifs de recherche

À la lumière de toutes ces données, il est évident que STAU1 est une protéine multifonctionnelle d'impact majeur dans le mécanisme de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Une défaillance dans ce mécanisme pourrait être associée à l'apparition des pathologies neurodégénératives et neuromusculaires, ainsi qu'au développement et progression tumorale. STAU1 se lie à des ARNm spécifiques pour réguler leur épissage, leur localisation, leur stabilité et leur traduction. Grâce à ses implications diversifiées dans le métabolisme de ses transcrits cibles, STAU1 contribue dans la modulation de nombreuses fonctions physiologiques, notamment la différenciation et la prolifération cellulaire. D'ailleurs, le niveau d'expression de STAU1 varie en fonction du cycle cellulaire pour avoir une abondance plus importante en mitose. En prométaphase, STAU1 se trouve associé à des transcrits qui codent pour des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. En outre, STAU1 a été identifié parmi les composants de l'appareil mitotique purifié à partir de cellules humaines.

Compte tenu de ce qui précède, nous avons donc émis l'hypothèse que STAU1 pourrait être impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de la mitose par le transport et la localisation des transcrits spécifiques sur le fuseau mitotique.

Dans cette optique, voici les objectifs de recherche que nous nous sommes fixés. Dans un premier temps, créer et caractériser des lignées cellulaires qui n'expriment pas STAU1 endogène (STAU1-KO). Dans un second, comparer le profilage transcriptomique de STAU1-KO vs WT. Notre troisième objectif consiste à étudier la distribution subcellulaire de STAU1 durant la mitose. Dans un quatrième temps, nous avons entrepris de caractériser les déterminants moléculaires impliqués dans cette localisation. Notre objectif numéro cinq consiste à identifier les ARNm enrichis par STAU1 sur le fuseau mitotique. Enfin, nous avons voulu déterminer l'importance de

STAU1 dans la mise en place d'un phénomène de traduction local sur le fuseau mitotique. Les cellules de cancer colorectal humain (HCT116) et celles des cellules épithéliales de la rétine immortalisée hTERT-RPE1 constituent nos modèles cellulaires d'études.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sont présentés sous forme de deux articles. Le premier manuscrit propose les résultats des deux premiers objectifs. Cependant, le deuxième article présente les résultats obtenus par les autres objectifs de travail.

2 Résultats

2.1 Article 1: Characterization of STAU1 CRISPR-knockout in the colorectal cancer cell line HCT116

Contribution des auteurs :

J'ai partagé la gestion du projet avec Dr Luc DesGroseillers. J'ai réalisé les expériences de création de lignées cellulaires STAU1-KO par CRISPR/Cas9, d'analyses par FACS, de formation de colonies, de courbes de croissance, d'extraction d'ARN pour RNA-Seq, de réactions de PCR quantitatif, d'immunobuvardages et de microscopie confocale. Les résultats obtenus sont présentés aux figures suivantes : Fig. 1; Fig. 3; Fig. 4 A et Fig. 5 D. J'ai également collaboré avec LP Benoit-Bouvrette pour illustrer les résultats obtenus par analyses bio-informatiques dans la Fig. 4 B-C, la Fig. 5 A-C, ainsi que les tableaux S1, S2 et S3 en collaboration avec Dr Luc DesGroseillers.

Au niveau de l'écriture du manuscrit, j'ai conçu l'ensemble des figures et rédigé les légendes, la section matériel et méthodes, ainsi que le matériel supplémentaire (tableaux S1-S3). Dr Luc DesGroseillers a rédigé toutes les autres sections. Conjointement avec les autres auteurs, j'ai contribué à la révision de l'ensemble du manuscrit.

Louis-Philip Benoit-Bouvrette a effectué l'ensemble des analyses bio-informatiques de la Fig. 4 B-C et la Fig. 5. Florence Bonnet-MagnaVal a effectué le séquençage de l'ADN génomique de la Fig. 3, le test de migration cellulaire (Scratch test) et l'essai de formation de colonies sur gel d'agarose (données non présentées). Mehdi Ghram, et Dr Éric Lecuyer ont contribué à la révision de l'ensemble du manuscrit.

Dr Luc DesGroseillers : Supervision générale et écriture du manuscrit.

**Characterization of STAU1 CRISPR-knockout in the colorectal cancer cell
line HCT116**

*Sami Hassine¹, Louis-Philip Benoit-Bouvette^{1,2}, Florence Bonnet-Magnaval¹, Mehdi
Ghram¹, Eric Lecuyer^{1,2}, and Luc DesGroseillers^{1, *}*

¹ Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

² Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

*** To whom correspondence should be addressed:**

Dr Luc DesGroseillers, Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit Montréal, QC, Canada. H3T 1J4. Phone: 514-343-5802. Fax: 514-343-2210. Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

Short title: STAU1-knockout HCT116 cells

ABSTRACT

Staufen1 (STAU1) is a double-stranded RNA-binding protein that controls the localization, decay, translation and splicing of mRNAs. Interestingly, its overexpression in cancer cell lines hinders mitosis progression and cell proliferation. To determine if STAU1 expression is essential for cancer cell proliferation, STAU1 knockout (STAU1-KO) cells were generated from the HCT116 colorectal tumor cell line using the CRISPR/Cas9 genome editing system. Two different RNA guides were used that targeted exon 5 of the *STAU1* gene, and the screening of individual cells identified STAU1-KO clones in a proportion of 18% and 44%, respectively. DNA sequencing of the STAU1 genomic alleles of STAU1-KO clones confirms the modification of the STAU1 open reading frame on both alleles. Consequently, the protein is completely depleted from the cells. Our results indicate that STAU1-KO cells survive and proliferate as do wild-type HCT116 cells. Indeed, STAU1-KO has no effect on cell proliferation and cell migration *in vitro*. A genome-wide analysis identifies 103 coding sequences and five long non-coding RNAs that are misregulated in CR1.3 cells compared to WT cells. Interestingly, genes annotated to function in “Negative regulation of cell differentiation” and “Epithelial cell differentiation” were overrepresented in the list of misregulated genes and may represent a functional STAU1-regulated RNA regulon.

KEYWORDS: Staufen1, CRISPR/Cas9; Transcriptomics; HCT116 cells.

INTRODUCTION

Staufen1 (STAU1) is a ubiquitously expressed RNA-binding protein. Alternative splicing of its transcribed RNA generates protein isoforms of 55 kDa and 63 kDa (1-3), the 63 kDa proteins exhibiting an 81-amino-acid extension at its N-terminus compared to the 55 kDa variant. STAU1 binds double-stranded regions within target RNAs and is involved in the post-transcriptional regulation of their expression. A large fraction of STAU1-bound mRNAs is associated with translating ribosomes (4-6). Genome-wide analyses reveal that STAU1-bound mRNAs code for proteins with heterogeneous functions including transcription, translation, cell growth and regulation of cell cycle (4, 5, 7-10).

STAU1 is a major regulator of RNA transport (11-13), translation (4, 5, 14), decay (15, 16), nuclear export (17, 18) and splicing (18). All of these functions of STAU1 are likely very important for cell physiology as compelling data indicate that STAU1 regulates cell differentiation (16, 19-25), dendritic spine morphogenesis (13, 26), cell proliferation (27), as well as long-term synaptic plasticity (26), a mechanism for long term memory. In addition, misregulation of STAU1-mediated post-transcriptional mechanisms of gene regulation accelerates cancer progression and regulates apoptosis (28-32). Indeed, impaired STAU1-mediated RNA decay (SMD) can occur as a consequence of upregulation of lncRNAs that bind specific STAU1-bound mRNAs and compete for STAU1 binding. In gastric cancer, this causes enhanced degradation of mRNAs coding for cell cycle inhibitors and thus acceleration of cancer progression (28-30). In colorectal cancers, upregulation of SNHG5 lncRNA prevents STAU1-mediated degradation of mRNA coding for cell survival proteins and protects stressed cells from apoptosis (31). Similarly, SMD-regulated

degradation of mRNAs coding for anti-apoptotic proteins is inhibited by activation of adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) in stressed cells (32).

Interestingly, STAU1 expression levels vary during the cell cycle (27). STAU1 levels rapidly decrease as cells transit through mitosis. Its degradation is mediated by the ubiquitin-proteasome system following its association with the E3 ubiquitin ligase anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) via its co-activators CDH1 and CDC20 (27). Therefore, modulation of STAU1 levels by cell cycle effectors may dictate the post-transcriptional expression of its bound transcripts and may contribute to the control of cell proliferation. Accordingly, a moderate overexpression of STAU1 in cancer cells impairs entry into mitosis and cell proliferation (27, 33). Strikingly, STAU1 overexpression has no effect in non-transformed cells (27) indicating that the types and importance of cellular defects following a modulation of STAU1 levels depends on cellular contexts.

However, the consequence of STAU1 depletion in cancer cells is not known. In order to determine if STAU1 is required for cancer cell growth, we generated STAU1-knockout (STAU1-KO) cells using the CRISPR/Cas9 technology in the colorectal cancer cell line HCT116. In this paper, we show that STAU1 expression is not essential for cancer cell survival or proliferation, at least in petri dishes. Nevertheless, using a genome-wide approach, we identified 103 genes that are misregulated in STAU1-KO cells compared to parental wild type (WT) HCT116 cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of STAU1-KO HCT116 cell lines

To study the consequences of STAU1 depletion in cancer cells, HCT116 cells were transfected with plasmids expressing the CRISPR/Cas9 system using either one of two different guide RNAs (sgRNA1 and sgRNA2) that targeted exon 5 of the *STAU1* gene (Figure 1A). Exon 5 was used as the target site for CRISPR edition since it is just downstream of the four AUG initiation codons located in exon 4, thus preventing alternative use of a downstream AUG codon and expression of a protein. These AUG codons are present within the first 25 N-terminal amino acids of the 55 kDa protein. To identify valid knockout clones and characterize the CRISPR-induced lesions, individual cells were plated, and several clones were isolated and tested for STAU1 expression using anti-STAU1 antibody and western blotting. Interestingly, 18% (two out of the CR1.1 to CR1.11 clones) and 44% (eight out of the CR2.1 to CR2.18 clones) of the clones that were transfected with CRISPR sgRNA1 and CRISPR sgRNA2, respectively, were negative for STAU1 expression. No trace of truncated proteins was observed. Since STAU1 55 kDa and 63 kDa isoforms are expressed from the same open reading frame as a consequence of alternative splicing of exon 3 (2), all STAU1 isoforms were knocked-out in these cells. In this paper we report the characterization of the CR1.3 clone. The CR1.2 cell line that expresses STAU1 even if it was transfected with the CRISPR/Cas9 tool was used as a negative control. Western blot analysis demonstrates that the amounts of STAU1 protein were completely depleted in CR1.3 cells compared to CR1.2 and WT cell lines (Figure 1B). Using RT-qPCR quantification, we observed that the amount of STAU1 mRNA was also reduced in CR1.3 cells compared to wild-type cells (Figure 1C). These data indicate that STAU1 isoforms can be completely depleted from HCT116 cells and therefore that they are not essential for survival of this cancer cell line.

STAU2 expression is not modified in STAU1-KO cells

To determine if STAU1 knockout alters cell structures, WT and CR1.3 cells were stained with anti- STAU1 and anti-tubulin antibodies and observed under confocal microscope. As expected, STAU1 was not detected in CR1.3 cells (Figure 1D top panel). Nevertheless, cell morphology and tubulin expression were similar in both cell types. Then, as the double-stranded RNA-binding paralogue STAU2 protein has similar molecular functions as STAU1 (34), it is possible that STAU2 expression may be modified in STAU1-KO cells to compensate for the loss of STAU1 and thus allow cell to survive. To test this possibility, cells were stained with anti-STAU2 and anti-tubulin antibodies and observed under confocal microscope (Figure 1D bottom panel). STAU2 localization was similar in CR1.3 and WT cells. In addition, western blotting experiments indicated that STAU2 expression was not changed in STAU1-KO (CR1.3) clone compared to wild-type cells or to CRISPR-derived cell lines (CR1.2) that still express STAU1 (Figure 1B). STAU2 mRNA expression, normalized to that of GAPDH, was also similar in CR1.3 cells compared to WT cells (Figure 1C). Therefore, STAU2 expression is not changed in STAU1-KO cells and does not compensate for STAU1 depletion.

Although STAU1 and STAU2 were shown to share some functions at least during SMD (35, 36), they seem to be mainly independent paralogues. They were shown to be present in different RNA granules in the dendrites of hippocampal neurons (34) and to bind mainly different populations of RNAs in HEK293 cells (7), indicating that they play different physiological roles. Indeed, in neurons, STAU1 is required for long-term synaptic potentiation (26) whereas STAU2 is necessary for long-term depression (37). Similarly, STAU2 expression is sensitive to DNA damages while STAU1 expression is not (38).

Genomic organization of the knockout cells

To characterize the *STAU1* gene at the molecular level in STAU1-KO cells, exon 5 was PCR amplified from genomic DNA isolated from the CRISPR CR1.3 cell line. PCR fragments were cloned, and several clones were sequenced to characterize both alleles (Figure 2). Sequencing data indicated that both alleles of CR1.3 genomic DNA were edited: one allele showed a deletion of eight nucleotides whereas the other allele had an insertion of 176 nucleotides (Figure 2). As control, we also cloned and sequenced the exon 5 alleles of the CR1.2 clone, a negative CRISPR-derived cell line that still expresses STAU1. Consistently, only WT sequences were obtained (not shown). These data confirm editing of the *STAU1* gene on both alleles of STAU1-KO cells and explain at the molecular level the loss of STAU1 protein isoforms in these cells.

STAU1 knockout has no effect on proliferation and migration of HCT116 cancer cells

We have previously shown that its overexpression impairs mitosis and cell proliferation in HCT116 cells (27). Therefore, colony formation assays were performed with STAU1-KO (CR1.3) and control (WT and CR1.2) cells (Figure 3, A and B). Results indicated that the three cell lines proliferate similarly, indicating that STAU1 expression is not required for proper cell proliferation in this cancer cell line. This is consistent with previous reports that showed that STAU1 depletion by siRNAs or shRNAs had no detectable effect on proliferation of several transformed cell lines (27). Interestingly, we also transfected the CRISPR/Cas9 plasmid in the non-transformed hTERT-RPE1 cells and were unable to generate STAU1-KO cells in a screen of more than 300 clones (39), suggesting that the indispensability of STAU1 is not the same in transformed and non-transformed cells and that pathways that are regulated by STAU1 in non-transformed cells are likely modified or overcome in cancer cells.

In embryonal rhabdomyosarcoma RD cells, STAU1 depletion by shRNAs was shown to reduce cell proliferation, cell invasion and cell motility *in vitro* and tumor growth *in vivo* (40). Therefore, STAU1-KO cells were further tested for their ability to grow in soft agar (41). This anchorage-independent growth assay evaluates tumor cell ability to grow independently of a solid surface. STAU1-KO (CR1.3) and control (WT and CR1.2) cells were plated in soft agar and allowed to grow for 21 days. The colonies obtained in STAU1-KO CR1.3 cells were similar to those observed in WT or CR1.2 cells, indicating that the capacity of HCT116 cells to grow in soft agar is not impacted by the loss of STAU1 (data not shown). The soft agar assay is considered the most accurate and stringent *in vitro* assay for detecting malignant transformation of cells (42).

Similarly, we tested if STAU1 depletion influences cell migration. WT and CR1.3 cells were plated and allowed to grow. A scratch was made, and cells were observed under the microscope for 24h with pictures taken every hour. Cells were analyzed, and migration reported as the distance traveled during 24h. No differences were observed (data not shown).

Comparison of the WT and STAU1-KO transcriptomes

To identify misregulated genes in STAU1-KO cells, we compared the transcriptomes of WT and CR1.3 cells. To this end, RNAs were isolated and the quality of extracted RNAs in all samples was confirmed with RNA pico chips (Figure 4A). RNA-seq was then performed to establish differential gene expression in WT and CR1.3 cells. RNA-seq profiles were first compared by a principal component analysis (PCA) which showed that RNA-seq replicates are grouped according to the cell lines used confirming the reproducibility of the data (Figure 4B). Similar conclusions were reached from analysis of the correlation coefficients between replicates that showed high levels of Pearson correlation between replicates of CR1.3 cells (value equals to 0.999) and between

those of WT cells (value equals to 0,998) (Figure 5B). Similarly, high levels of correlation were observed between WT and CR1.3 replicates (Figure 4C).

Using FPKM of 1 as a threshold value for gene expression, we observed that 17 788 genes are expressed in HCT116 cells. Their level of expression in CR1.3 cells was compared to that in WT cells. Interestingly, when aligned on the genome, RNA reads were almost absent in the region of STAU1 exon 5 corresponding to CRISPR sgRNA1 in CR1.3 cells compared to WT cells (Figure 1A). Then, transcript biotype analysis revealed similar profiles of RNA species in CR1.3 and WT cells indicating that STAU1 depletion did not significantly modify expression of specific pools of RNA biotypes (Figure 5A). Accordingly, a genome-wide analysis of RNA expression revealed that only 108 RNAs were misregulated in STAU1-KO cells compared to WT cells (Figure 5, B and C) (fold change ≥ 2 , adjusted p-value ≤ 0.05). Within upregulated genes, 35 were protein-coding mRNAs and four were lncRNA (Supp Table 1). Similarly, within downregulated RNAs, 68 protein-coding mRNAs and one lncRNA were identified (Supp Table 2). As expected, STAU1 mRNA was decreased in CR1.3 cells (Log₂ Fold Change: -2.67, p-adjust; 1.77E-32).

Then, to determine if specific mRNA regulons are targeted by STAU1 knockout, the biological functions of misregulated RNAs was analyzed with the METASCAPE Gene Annotation & Analysis Resource (43) (<http://metascape.org/>). Interestingly, the GO classification revealed an enrichment for the biological pathway “Substrate adhesion-dependent cell spreading” (Figure 5D). Ten genes are associated with this GO term and nine of them are downregulated in STAU1-KO cells. The role of the downregulated genes in cell adhesion and anchoring was previously reported in different cancer types as well as the consequences of their downregulation on cell proliferation, migration, invasion and/or metastasis (44-46). Strikingly, the only gene of this regulon that is upregulated in STAU1-KO cells is known to reduce PC3 cell migration when overexpressed (47).

Therefore, the regulation imposed by STAU1 depletion on at least some of these transcripts suggest that it might influence cell adhesion at least in certain environmental conditions and contribute to cancer cells development and/or migration *in vivo*.

Enrichment for other biological pathways was also identified (Supp Table 3). Interestingly, they correspond to previously established roles of STAU1 in cell differentiation (16, 19-22, 25, 48-50), long-term synaptic potentiation in hippocampal neurons (26), cell division (27) and response to stress (51). Our results shed new lights on the genes that may control these functions. STAU1 via its RNA-binding activity and the post-transcriptional regulation that it imposes on its target RNAs is likely to control the expression of different RNA regulons that, in turn, fine tune cell decision.

MATERIALS AND METHODS

STAU1-KO HCT116 cell line

STAU1-KO HCT116 cells were generated by the CRISPR/Cas9 technology (52). Briefly, HCT116 cells were transfected with plasmid coding for GFP, Cas9 and a sgRNA targeting exon 5 of the *STAU1* gene (Horizon Discovery), using Lipofectamine 3000 (Life Technologies/Thermo Fisher). Forty-eight hours post-transfection, GFP positive cells were sorted by FACS and individual cells were grown into 96-well plates until colonies formed. Loss of STAU1 expression was monitored by western blotting using anti-STAU1 antibody. The colorectal HCT116 cell line and the CRISPR-derived clones were cultured in McCoy's medium with 10% fetal bovine serum (FBS), 20 mM glutamine and 1% penicillin–streptomycin (Wisent Bioproducts). Cell cultures were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

Soft agar and colony formation assays

For colony formation assays, cells were plated and allowed to grow for 8 days. Cells were fixed for 10 min in 1% (v/v) glutaraldehyde-PBS and stained with 0,1% (w/v) crystal violet in PBS for 45 min. Quantification of cell growth was determined by measuring the absorbance at 590 nm (27). For cell growth in soft agar, 15,000 cells in culture medium containing 0.35% agar were plated on a solidified culture medium containing 0.5% agar. Cells were allowed to grow for 21 days, fixed and stained with 0.1% crystal violet. The number of colonies was counted from quintuplet wells for each cell line.

Cell lysates, immunoblotting and antibodies

Cell lysates were prepared in Tris-SDS Buffer (250 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 5% (w/v) SDS, 100 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol (DTT) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich)) and analyzed by western blotting as before (27). Antibodies included anti-STAU1 (2, 53), anti-STAU2 (Sigma-Aldrich), anti- β -actin (Sigma-Aldrich), and anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibodies (DAKO).

Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded onto poly-L-lysine-treated coverslips and incubated overnight at 37°C. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature and permeabilized in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.7), 0.5% Triton-X-100 (v/v) and 0.1% BSA (w/v) for 5 minutes. Fixed cells were washed thrice in PBS and blocked in PBS containing 0.1% BSA, 0.02% sodium azide and 1% goat serum for one hour at room temperature. Cells were immuno-stained in blocking buffer containing anti-STAU1 (14), anti-STAU2 (Sigma Aldrich) or anti-tubulin antibodies (Abcam) for 1 h at room temperature or 16h at 4°C. Secondary fluorochrome-conjugated antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, or Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit; Molecular Probes-Invitrogen) were added for 1h at room temperature. Coverslips were washed and mounted on glass slides using ProLongTM Diamond Antifade mountant media (Thermo Fisher Scientific) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were acquired with an inverted Axio Observer Z1 confocal spinning disk microscope (ZEISS). Images processing was performed using Zen elite blue edition or ImageJ software.

Genomic DNA sequencing

Genomic DNA was isolated (Bio Basic) and PCR-amplified using the Phusion polymerase (NEB) and specific primers flanking exon 5 of the *STAU1* gene (sense: 5' AGCCAAGTTTTTGTCTCAGCC 3'; antisense: 5' ACAGCTGTCAATGTGCCTTCT 3'). PCR products were cloned into a pBluescript SK (+) vector (Stratagene). Ten clones were randomly chosen and sequenced (Genome Québec).

RNAseq and Differential gene expression analysis

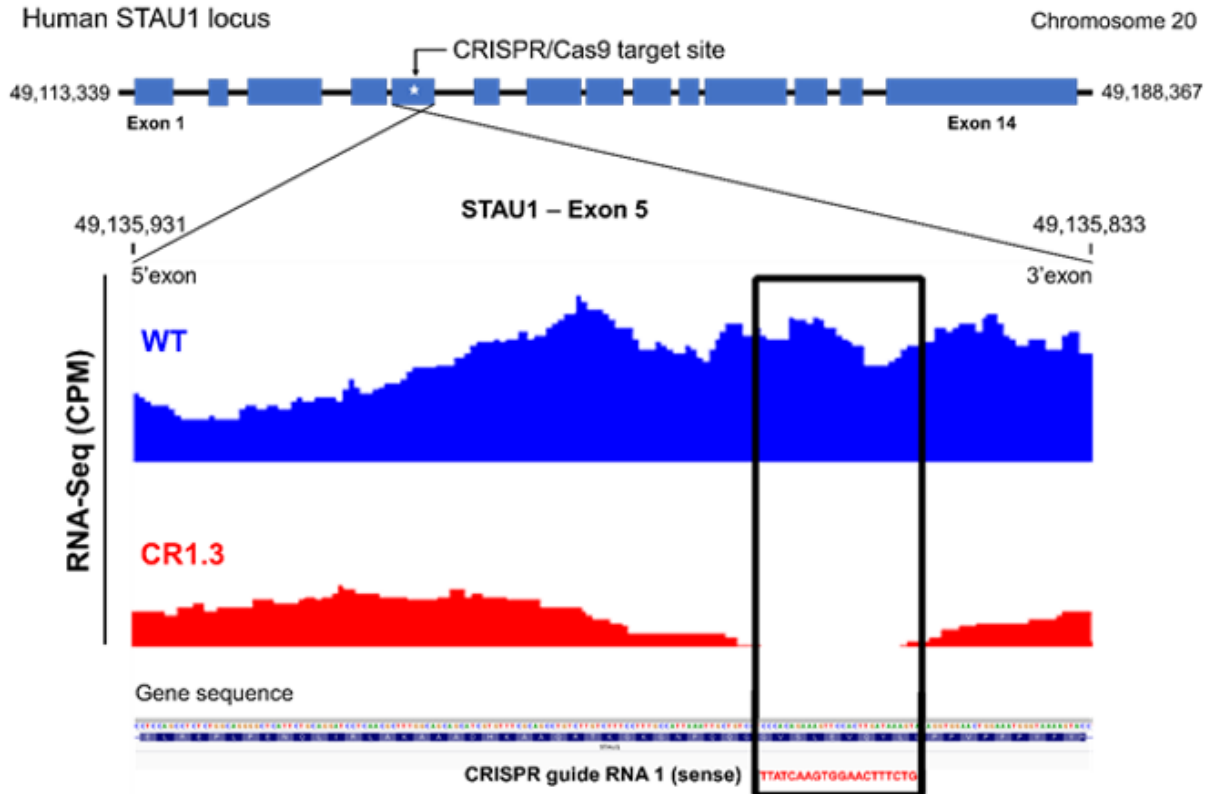
HCT116 were lysed in Trizol reagent (Life technologies) and RNA extracted. TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to eliminate DNA contamination and RNA was purified with RNeasy mini kit (Qiagen). RNAseq libraries were prepared using TruSeq stranded total RNA sample preparation kit (Illumina). Read quality was assessed using FastQC. No trimming was deemed necessary. Read alignment was executed using TopHat on the Human GRCh37 genomes from Ensembl (54). The GTF annotation file used during the alignment and for counting the number of reads aligned to each feature was also downloaded from Ensembl (release 75). Read count was obtained with featureCounts (55). Normalized count values (FPKM) and differential expression was computed with DESeq2 (56). Gene biotypes and additional information were obtained via the biomaRt R library (57). All correlations and analysis were performed using R.

ACKNOWLEDGMENTS

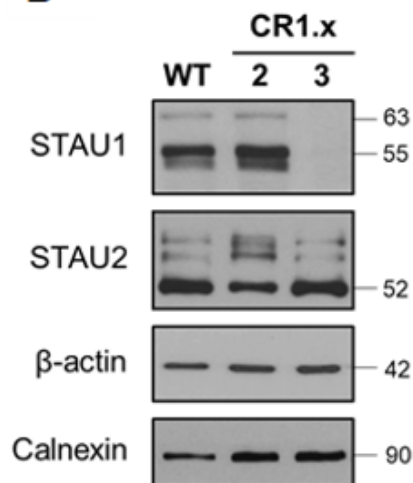
We are grateful to Alexis Blanchet-Cohen and Matt Sarrasin for their help in RNA-seq data processing and analysis; Pascal Raymond and Monique Vasseur for their assistance in microscopy; Louise Cournoyer for her help in the growth and characterization of CRISPR-cell clones (Cell culture facility in the Département de biochimie et médecine moléculaire). We thank the cell sorting facility at Institut de Recherches en Immunologie et Cancer (IRIC) for selection of GFP-positive cells, the molecular biology and functional genomics core facilities at the Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM) and the gene expression analysis core facilities at Genome Quebec Innovation Centre (McGill University) for transcriptomics approaches. This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and by the Bristol-Myers-Squibb chair to LDG.

FIGURES AND LEGENDS

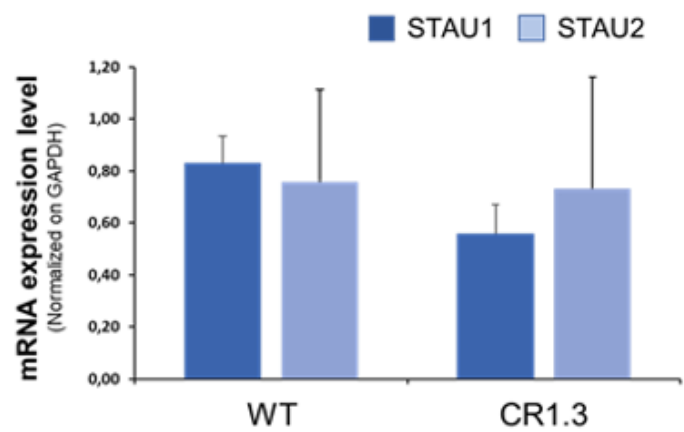
A



B



C



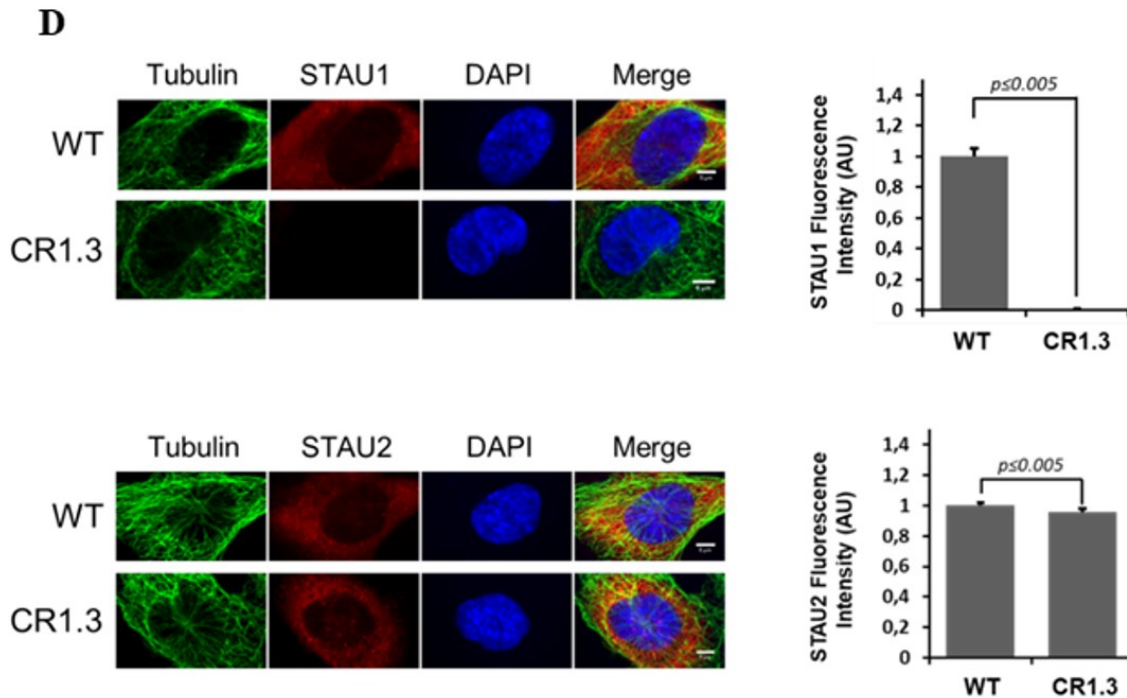


Figure - 1. Knockout of STAU1 in the colorectal HCT116 cancer cell line by the CRISPR/Cas9 complex system

(A) Schematic representation of the *STAU1* gene and comparison of reads alignment on exon 5 from WT (blue) and CR1.3 (red) cells are shown. The position of CRISPR/Cas9/sgRNA1 target site is indicated. Black box: regions altered by CRISPR/sgRNA1 (sense) used for STAU1 knockout. (B) HCT116 cells were transfected with plasmids expressing Cas9/sgRNA1 complex targeting exon 5 of the *STAU1* gene. Wild Type (WT) and two CRISPR-derived CR1.3 and CR1.2 cell lines were further screened by western blotting for STAU1 and STAU2 expression. Anti- β -actin and Anti-Calnexin antibodies were used as a loading and quality control. (C) Wild type (WT) and STAU1-KO (CR1.3) HCT116 cells were analyzed by RT-qPCR for STAU1 and STAU2 mRNAs expression level. (D) Wild type (WT) and STAU1-KO (CR1.3) HCT116 cells were fixed with 4% PFA, incubated in the presence of anti-STAU1 (top panel), anti-STAU2 (bottom panel) and anti-tubulin antibodies and visualized by confocal microscopy. DNA was counterstained with DAPI (blue).

Statistical diagrams indicate the fluorescence intensity of STAU1 (top right panel) and STAU2 (bottom right panel) in CR1.3 versus WT cells. The data is representative of more than 30 cells from three different cultures. Scale bar: 5 μ m.

WT target sequence :

TACTTTTACCCATTTCCAGTTCCACCTTTACT TTATCAAGTGGAAC TTTCTGTGGGAGGACAGCAATTTAA
sgRNA1 target sequence PAM

CR1.3 allele 1 :

TACTTTTACCCATTTCCAGTTCCACCTTTACT TTATCAAGTGGAAC TTT - - - - - GACAGCAATTTAA
deletion of 8 nucleotides

CR1.3 allele 2 :

TACTTTTACCCATTTCCAGTTCCACCTTTACT TTATCAAGTGGAAC CAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTA
TGGAAAACGCCAGCTGTGGGAGGACAGCAATTTAA
insertion of 116 nucleotides

Figure - 2. Biallelic mutations in STAU1-KO clone (CR1.3)

DNA sequence of STAU1-KO cell line CR1.3. Genomic DNA was amplified by PCR and resulting fragments were cloned in pBluescript vector and sequenced. Sequences of wild type (WT) and CR1.3 alleles are shown. Red: Target sequences of the CRISPR sgRNA1. Green: Inserted nucleotides. Dash line: Deleted nucleotides.

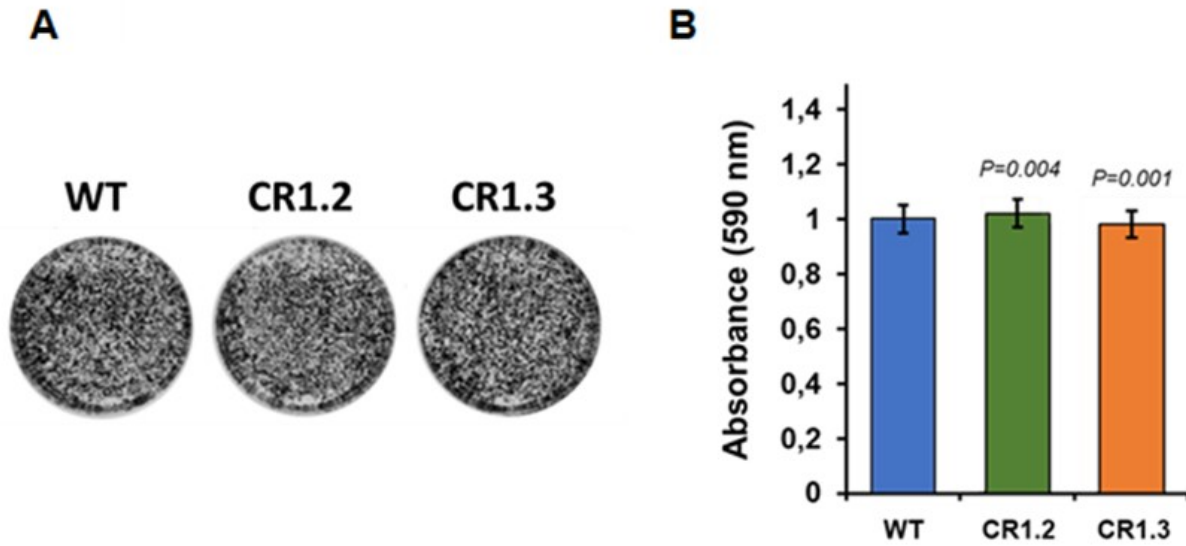


Figure - 3. Phenotype analysis of STAU1-KO CR1.3 cell line

(A) Cells were plated at the same density and allowed to grow for ten days and stained with crystal violet. Data are representative of three independent experiments. (B) Crystal violet was extracted and quantified by measuring absorbance at 590 nm. Quantification of the relative amounts of stain in CR1.2 and CR1.3 cells compared to WT is expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments, absorbance of wild-type cells being arbitrarily fixed to 1. Cells were plated in soft agar at 1.5×10^4 cells/plate and allowed to grow for 21 days. Data are representative of two independent experiments done in quintuplets.

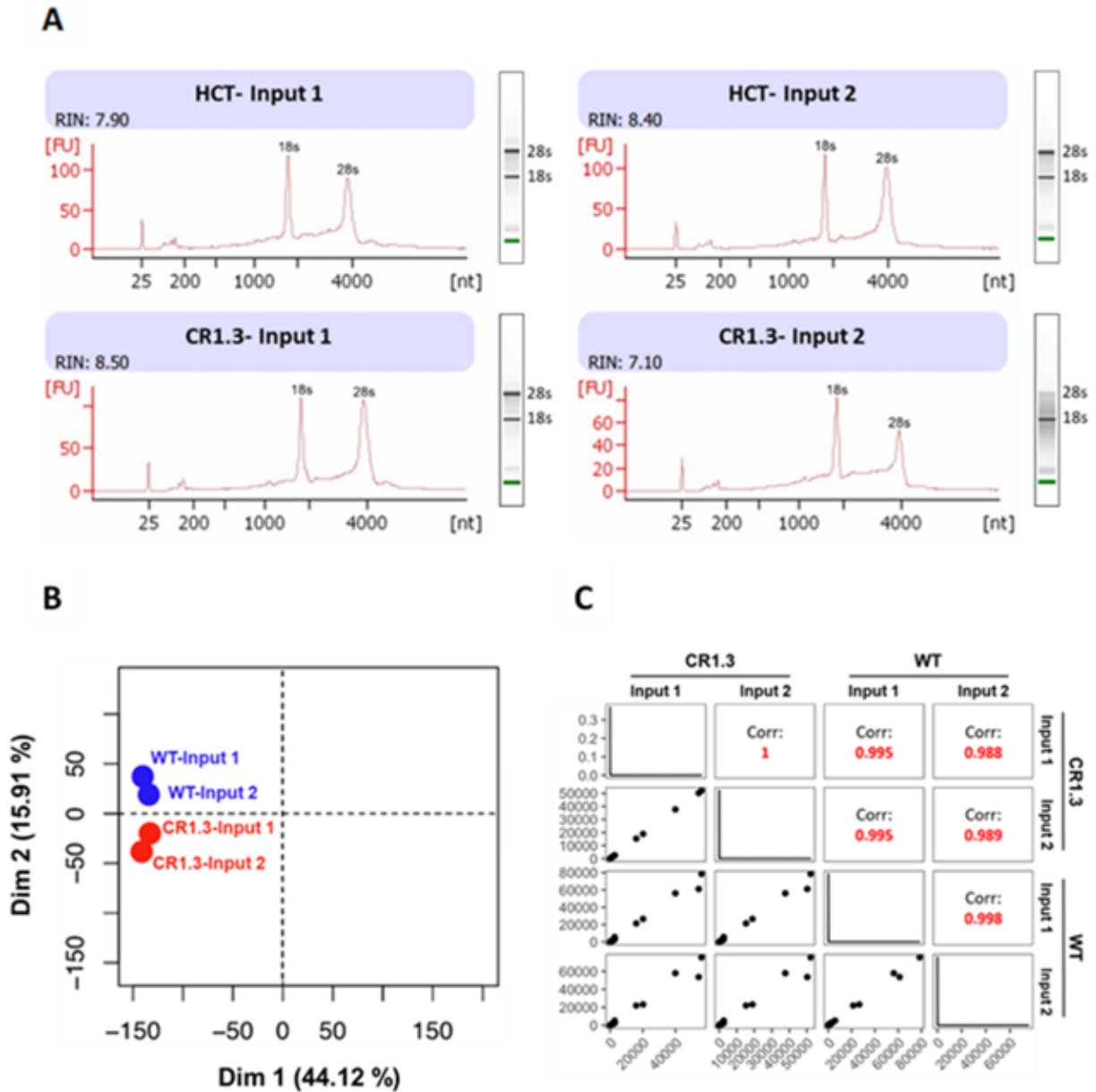
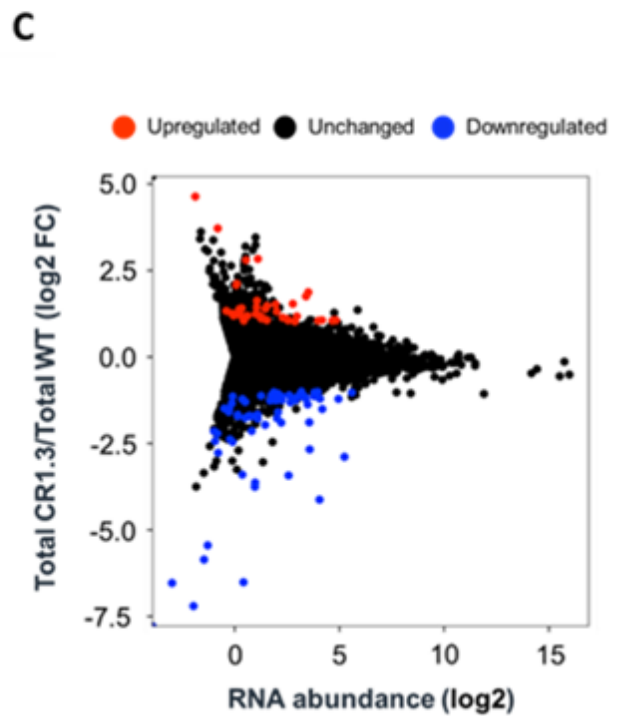
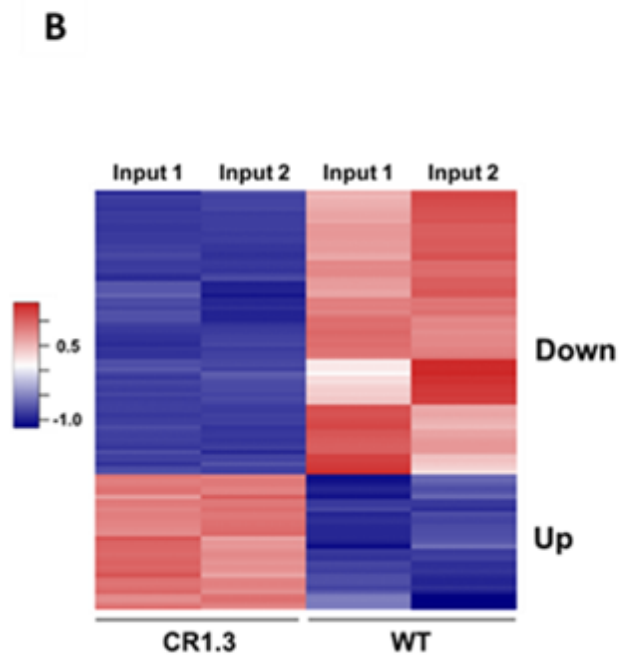
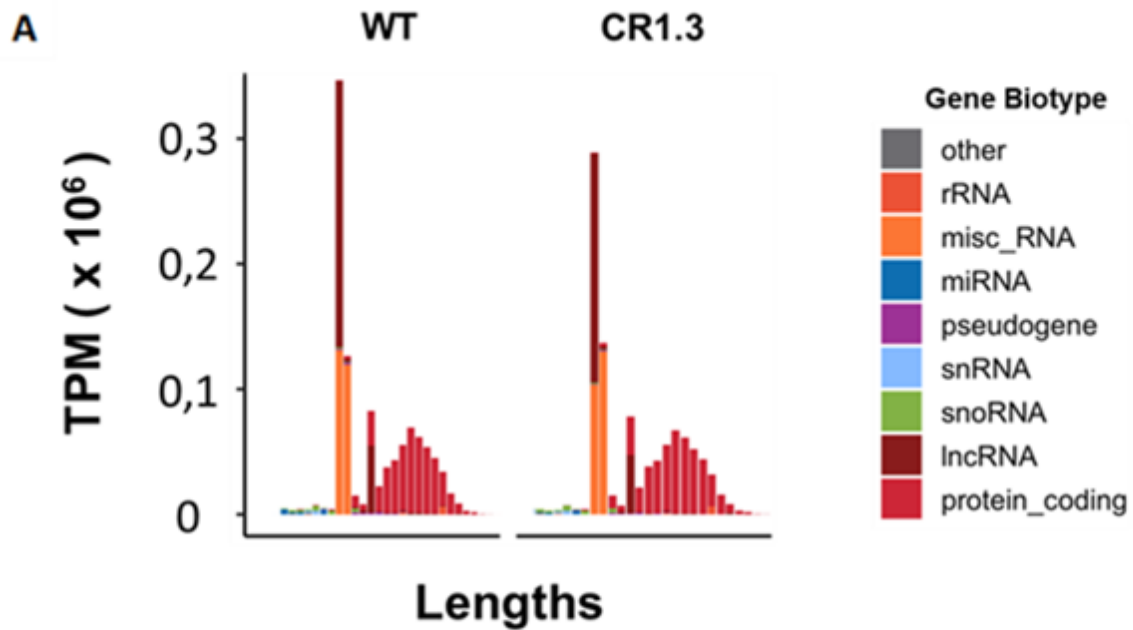


Figure - 4. Quality control of isolated RNAs

(A) RNAs were isolated from WT and CR1.3 STAU1-KO cells. Quality of extracted RNAs in each sample (Input) was analyzed with RNA pico chips. (B) RNA-seq data from replicates prepared from WT and CR1.3 cells were plotted on PCA plots. (C) Pearson coefficient of correlation between replicates.



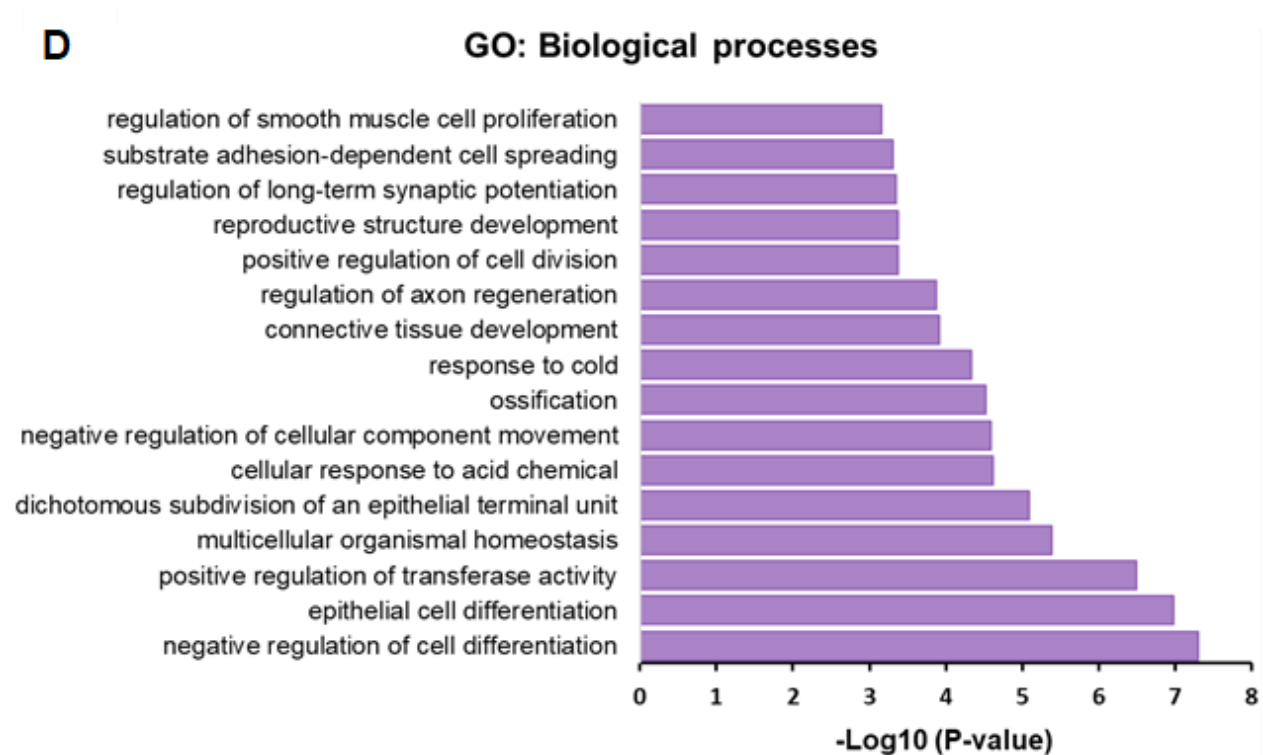


Figure - 5. Whole-genome differential expression genes (DEGs) profiling in STAU1-KO CR1.3 versus WT cells

Whole-genome differential expression genes profiling was performed using total RNA isolated from STAU1-KO CR1.3 and WT HCT116 cells. (A) Histogram depicting RNA biotype content in WT and STAU1-KO cells, binned according to the length of the longest annotated isoform. Biotypes accounting for less than 1% of the overall TPMs were grouped as “other”. (B) Heatmap of log₂ normalized read counts. RNAs that are up- or down-regulated in STAU1-KO versus WT HCT116 cells (fold change ≥ 2 , adjusted p-value ≤ 0.05) are shown. Red color: high expression values; Blue color: low expression values. In: input replicates. (C) MaPlot of RNA abundance in CR1.3 vs. WT cells. Red and blue dots represent genes that are up- or down-regulated in CR1.3 vs. WT cells (fold change ≥ 2 , adjusted p-value ≤ 0.05), respectively. (D) Gene ontology (GO) enrichment analysis of the differentially dysregulated genes in CR1.3 vs. control cells (WT an CR1.2) based on the Biological Processes category.

REFERENCES

1. Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(3):2212-9.
2. Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(3):2220-30.
3. Duchaine T, Wang HJ, Luo M, Steinberg SV, Nabi IR, DesGroseillers L. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(15):5592-601.
4. Ricci EP, Kucukural A, Cenik C, Mercier BC, Singh G, Heyer EE, et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(1):26-35.
5. de Lucas S, Oliveros JC, Chagoyen M, Ortin J. Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic acids research*. 2014;42(7):4516-26.
6. Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal*. 2002;365(Pt 3):817-24.
7. Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, NY)*. 2008;14(2):324-35.
8. Laver JD, Li X, Ancevicus K, Westwood JT, Smibert CA, Morris QD, et al. Genome-wide analysis of Staufen-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic acids research*. 2013;41(20):9438-60.
9. LeGendre JB, Campbell ZT, Kroll-Conner P, Anderson P, Kimble J, Wickens M. RNA targets and specificity of Staufen, a double-stranded RNA-binding protein in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(4):2532-45.
10. 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;519(7544):491-4.
11. Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*. 2004;43(4):513-25.
12. Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, et al. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(1):288-97.
13. Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, et al. A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16374-9.

14. 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;33(15):4797-812.
15. 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;120(2):195-208.
16. Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, DesGroseillers L, Maquat LE. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal*. 2007;26(11):2670-81.
17. 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 & development*. 2013;27(13):1495-510.
18. Ravel-Chapuis A, Belanger G, Yadava RS, Mahadevan MS, DesGroseillers L, Cote J, et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology*. 2012;196(6):699-712.
19. Belanger G, Stocksley MA, Vandromme M, Schaeffer L, Furic L, DesGroseillers L, et al. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(3):669-77.
20. Gautrey H, McConnell J, Lako M, Hall J, Hesketh J. Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783(10):1935-42.
21. Yamaguchi Y, Oohinata R, Naiki T, Irie K. Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2008;13(6):583-92.
22. Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development*. 2009;23(1):54-66.
23. Kretz M. TINCR, staufen1, and cellular differentiation. *RNA biology*. 2013;10(10):1597-601.
24. Cho H, Kim KM, Han S, Choe J, Park SG, Choi SS, et al. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Molecular cell*. 2012;46(4):495-506.
25. Ravel-Chapuis A, Crawford TE, Blais-Crepeau ML, Belanger G, Richer CT, Jasmin BJ. The RNA-binding protein Staufen1 impairs myogenic differentiation via a c-myc-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(23):3765-78.
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. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(9):2896-907.
27. Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trepanier V, Mollet S, Frechina C, et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic acids research*. 2014;42(12):7867-83.

28. Xu TP, Liu XX, Xia R, Yin L, Kong R, Chen WM, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene*. 2015;34(45):5648-61.
29. Xu TP, Wang YF, Xiong WL, Ma P, Wang WY, Chen WM, et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell death & disease*. 2017;8(6):e2837.
30. Liu Z, Chen Z, Fan R, Jiang B, Chen X, Chen Q, et al. Over-expressed long noncoding RNA HOXA11-AS promotes cell cycle progression and metastasis in gastric cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):82.
31. 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. *Nature communications*. 2016;7:13875.
32. Sakurai M, Shiromoto Y, Ota H, Song C, Kossenkov AV, Wickramasinghe J, et al. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*. 2017;24(6):534-43.
33. Wan D, Gong Y, Qin W, Zhang P, Li J, Wei L, et al. Large-scale cDNA transfection screening for genes related to cancer development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15724-9.
34. Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 16):3285-95.
35. Park E, Maquat LE. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2013;4(4):423-35.
36. Park E, Gleghorn ML, Maquat LE. Staufen2 functions in Staufen1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(2):405-12.
37. Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, et al. Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*. 2011;18(5):314-26.
38. Zhang X, Trépanier V, Beaujois R, Viranaicken W, Drobetsky E, DesGroseillers L. The downregulation of the RNA-binding protein Staufen2 in response to DNA damage promotes apoptosis. *Nucleic acids research*. 2016;44(8):3695-712.
39. 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;432(13):3881-97.
40. Crawford Parks TE, Marcellus KA, Langill J, Ravel-Chapuis A, Michaud J, Cowan KN, et al. Novel Roles for Staufen1 in Embryonal and Alveolar Rhabdomyosarcoma via c-myc-dependent and -independent events. *Scientific reports*. 2017;7:42342.

41. Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med.* 1956;103(2):273-83.
42. Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1975;72(11):4435-9.
43. Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, et al. Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe.* 2015;18(6):723-35.
44. Yu Y, Suryo Rahmanto Y, Lee MH, Wu PH, Phillip JM, Huang CH, et al. Inhibition of ovarian tumor cell invasiveness by targeting SYK in the tyrosine kinase signaling pathway. *Oncogene.* 2018;37(28):3778-89.
45. Donnelly SK, Cabrera R, Mao SPH, Christin JR, Wu B, Guo W, et al. Rac3 regulates breast cancer invasion and metastasis by controlling adhesion and matrix degradation. *The Journal of cell biology.* 2017;216(12):4331-49.
46. Wang D, Li Y, Zhang C, Li X, Yu J. MiR-216a-3p inhibits colorectal cancer cell proliferation through direct targeting COX-2 and ALOX5. *J Cell Biochem.* 2018;119(2):1755-66.
47. Hoyne G, Rudnicka C, Sang QX, Roycik M, Howarth S, Leedman P, et al. Genetic and cellular studies highlight that A Disintegrin and Metalloproteinase 19 is a protective biomarker in human prostate cancer. *BMC Cancer.* 2016;16:151.
48. Peredo J, Villace P, Ortin J, de Lucas S. Human Staufen1 associates to miRNAs involved in neuronal cell differentiation and is required for correct dendritic formation. *PloS one.* 2014;9(11):e113704.
49. Oh Y, Park J, Kim JI, Chang MY, Lee SH, Cho YH, et al. Lin28B and miR-142-3p regulate neuronal differentiation by modulating Staufen1 expression. *Cell death and differentiation.* 2018;25(2):432-43.
50. Cho H, Han S, Park OH, Kim YK. SMG1 regulates adipogenesis via targeting of staufen1-mediated mRNA decay. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1829(12):1276-87.
51. Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *Journal of cell science.* 2009;122(Pt 4):563-73.
52. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY).* 2012;337(6096):816-21.
53. Martel C, Dugre-Brisson S, Boulay K, Breton B, Lapointe G, Armando S, et al. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA (New York, NY).* 2010;16(3):585-97.
54. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562-78.
55. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923-30.

56. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010;11(10):R106.
57. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc.* 2009;4(8):1184-91.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1 - List of genes that are upregulated in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
VIM-AS1	24,87639342	0,013050842	lncRNA
RP11-277P12.20	4,338381792	0,003959799	lncRNA
LINC01405	2,873224281	0,008234667	lncRNA
AC159540.1	2,067789505	0,034838192	lncRNA
VIM	13,14624035	3,87402E-10	protein_coding
FGF9	7,131161429	2,02615E-18	protein_coding
PRKAA2	6,963401029	1,50093E-20	protein_coding
ZEB1	4,217557516	1,5213E-07	protein_coding
VCAN	3,654518323	1,33339E-18	protein_coding
TNIK	3,368481868	2,73591E-20	protein_coding
ETV1	3,085985895	1,12968E-09	protein_coding
CSTA	2,898937719	0,002797654	protein_coding
PDGFC	2,778051853	0,000103026	protein_coding

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
EPHA4	2,704289802	3,24551E-07	protein_coding
KLF12	2,652293966	0,000590545	protein_coding
CTHRC1	2,62246285	0,022337632	protein_coding
MAML2	2,606224443	0,015568039	protein_coding
SAMD3	2,51387292	0,006247725	protein_coding
ANKH	2,495517218	1,12968E-09	protein_coding
SNTB1	2,452820527	0,006224821	protein_coding
TRAF1	2,389098751	0,010448088	protein_coding
SEMA3A	2,36631298	4,37562E-06	protein_coding
COL7A1	2,297427796	0,000740904	protein_coding
COL13A1	2,296912563	0,00036497	protein_coding
CNTNAP3B	2,288272897	0,000577938	protein_coding
CNTNAP3	2,279477079	0,011181895	protein_coding
SEMA3C	2,252703406	1,62195E-08	protein_coding
LIX1L	2,199749898	0,000551937	protein_coding
ATP8B3	2,17811207	0,002797654	protein_coding
TNS2	2,1561068	0,006247725	protein_coding
TMEM200A	2,138252436	0,000676798	protein_coding

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
DUSP6	2,103071267	2,73747E-10	protein_coding
SLC27A1	2,091304413	0,000530106	protein_coding
SPRY4	2,085116303	4,40368E-07	protein_coding
MYH15	2,083639631	0,000274461	protein_coding
NT5E	2,081706616	1,76107E-06	protein_coding
SERINC2	2,064535565	0,002881204	protein_coding
ADAM19	2,060987108	3,47841E-07	protein_coding
C16orf45	2,035615483	0,006247725	protein_coding

Table S2 - List of genes that are downregulated in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
FAM83H-AS1	0,464101334	0,000116284	lncRNA
DDX3Y	0	2,88128E-11	protein_coding
EIF1AY	0	1,48004E-05	protein_coding
RPS4Y1	0	2,44277E-13	protein_coding
ANXA10	0,006800516	0,000376879	protein_coding
IL32	0,010783707	0,003191772	protein_coding
NRIP1	0,010964919	1,37633E-81	protein_coding
SYK	0,017249187	1,07201E-16	protein_coding
FXYD3	0,022932268	7,20859E-10	protein_coding
MAL2	0,057367101	1,49833E-51	protein_coding
DPYSL3	0,074111256	2,34464E-32	protein_coding
TACSTD2	0,080620064	6,82416E-07	protein_coding
KRT7	0,093038895	1,12968E-09	protein_coding
GALNT3	0,094632586	5,24547E-17	protein_coding
S100A14	0,135107183	2,60623E-25	protein_coding

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
PROM2	0,146455291	3,29382E-09	protein_coding
STAU1	0,156858451	1,76992E-32	protein_coding
PODXL2	0,182127823	0,002797654	protein_coding
STON2	0,185166398	1,48004E-05	protein_coding
KRT80	0,191629274	0,00112661	protein_coding
KRT13	0,215457296	0,013617012	protein_coding
ALOX5	0,226316436	0,002201436	protein_coding
DSC3	0,227115688	1,94157E-12	protein_coding
MACC1	0,256452283	4,8071E-16	protein_coding
GRHL2	0,268137424	2,47372E-19	protein_coding
ID2	0,269908099	5,83517E-15	protein_coding
TMEM125	0,289732203	0,002052861	protein_coding
KRT23	0,293485918	0,000138649	protein_coding
EPN3	0,293903626	1,32919E-06	protein_coding
C1orf106	0,300785169	4,38366E-08	protein_coding
RTN4RL1	0,304460956	0,000407908	protein_coding
MGLL	0,304941569	1,01125E-06	protein_coding
ATP2C2	0,30871495	3,19057E-08	protein_coding

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
C6orf132	0,314330202	1,16059E-05	protein_coding
ZNF516	0,316128051	2,96073E-14	protein_coding
PPP1R14C	0,331709929	0,000161919	protein_coding
AIM1L	0,332419108	0,001666322	protein_coding
ARRDC4	0,35188435	0,004972112	protein_coding
EML1	0,354845377	0,000685601	protein_coding
GNAL	0,356413844	0,011799421	protein_coding
VGFB	0,386190891	5,76585E-08	protein_coding
CYB5R2	0,395297362	0,006481131	protein_coding
KLF4	0,402600487	0,018378178	protein_coding
WNT7B	0,406450473	0,020518144	protein_coding
FAM107B	0,416711668	4,33662E-06	protein_coding
OVOL1	0,417497641	0,008234667	protein_coding
PPARG	0,419047029	0,006224821	protein_coding
GPAT2	0,420607573	4,28124E-07	protein_coding
SULT1A1	0,428911159	0,000216365	protein_coding
BTBD11	0,429251041	0,00390965	protein_coding
ELF3	0,430645087	0,000335031	protein_coding

Name	Fold change	Input.padj	Gene biotype
AP1M2	0,431206911	0,001420476	protein_coding
GALNT5	0,433076827	2,97927E-07	protein_coding
PDLIM1	0,442353257	0,002666087	protein_coding
ATP8B1	0,445149465	0,00306047	protein_coding
S100A2	0,451305666	0,012812773	protein_coding
UNC13D	0,453468227	0,017178452	protein_coding
EPHA1	0,454449767	0,000104638	protein_coding
NTHL1	0,455373506	0,003243484	protein_coding
CDH1	0,455783303	0,001956689	protein_coding
ADAP1	0,459795272	0,022928175	protein_coding
AIM1	0,462569932	0,000253411	protein_coding
WNT10B	0,465068257	0,007848349	protein_coding
FRRS1	0,480368015	0,011799421	protein_coding
RAC3	0,489999059	0,006224821	protein_coding
CAV2	0,491270558	0,001375869	protein_coding
SKAP2	0,493750888	0,000551937	protein_coding
IL18	0,495951179	0,005021932	protein_coding
AREG	0,498611296	0,017653059	protein_coding

Table S3 - Gene ontology of dysregulated genes in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells

(Metascope Gene Annotation & Analysis Resource)

Term	Description	LogP	Log(q-value)	InTerm_InList	Symbols
GO:0045596	Negative regulation of cell differentiation	-7,3023	-2,987	16/727	AREG,DPYSL3,EPHA4,FGF9,ID2,IL18,TACS TD2,PPARG,ZEB1,VIM,WNT10B,SEMA3A,SEMA3C,GRHL2,C16orf45,RTN4RL1,RAC3,KLF4,TNFK,CRTC1,ATP8B1,PROM2,COL7A1,EPHA1,ETV1,UNC13D,AURKB
GO:0030855	Epithelial cell differentiation	-6,9845	-2,971	16/767	CSTA,DSC3,ELF3,ID2,KRT7,KRT13,OVOL1,PPARG,ZEB1,VIM,WNT7B,WNT10B,KLF4,KRT23,GRHL2,KRT80,COL7A1
GO:0051347	Positive regulation of transferase activity	-6,4971	-2,659	14/628	DUSP6,EPHA4,IL18,SYK,WNT7B,AURKB,KLF4,TNFK,INAVA,PDGFC,GRHL2,ARRDC4,SERINC2,SLC27A1,CAV2,EPHA1,FGF9,SEMA3A,SPRY4,AREG,GALNT3,RTN4RL1
GO:0048871	Multicellular organismal homeostasis	-5,3835	-1,840	11/471	IL18,PRKAA2,RAC3,SYK,WNT10B,ZNF516,TNS2,CRTC1,INAVA,PDGFC,SLC27A1,ELF3,SEMA3C,CTHRC1,ALOX5,NT5E,PPARG,KLF4,MGLL,UNC13D
GO:0060600	Dichotomous subdivision of an epithelial terminal unit	-5,0910	-1,701	3/10	AREG,SEMA3A,SEMA3C,COL13A1,TACSTD2,GRHL2,EPHA4,WNT7B,KLF4,CTHRC1,COL7A1,ELF3,CDH1,ID2
M5885	NABA MATRISOME ASSOCIATED	-4,8538	-1,618	13/753	AREG,CSTA,FGF9,IL18,S100A2,WNT7B,WNT10B,ADAM19,SEMA3A,SEMA3C,ANXA10,PDGFC,S100A14,VGF,IL32,MACC1,PPARG

Term	Description	LogP	Log(q-value)	InTerm_InList	Symbols
M223	PID BETA CATENIN NUC PATHWAY	-4,6830	-1,597	5/80	CDH1,VCAN,ID2,KLF4,TNFK, COL7A1,COL13A1,ELF3,ADAM19 PPARG,PRKAA2,ZEB1,WNT7B,WNT10B,KLF4,PDGFC,AREG,CAV2,EPHA4,VGF,VIM,INAVA,SLC27A1,ID2,IL18,SYK,TRAF1,CRTC1,CDH1,ZNF516,NRIP1,OVOL1,SKAP2,TNS2
GO:0071229	Cellular response to acid chemical	-4,6129	-1,597	7/206	CDH1,DPYSL3,EPHA1,TACSTD2,PPARG,KLF4,SEMA3A,SEMA3C,C16orf45,AURKB,GRHL2,S100A2
GO:0051271	Negative regulation of cellular component movement	-4,5893	-1,597	9/374	AREG,COL13A1,VCAN,FGF9,ID2,WNT7B,WNT10B,ANKH,CTHRC1,CDH1,EML1,OVOL1,ELF3,PRKAA2,KLF4,TNFK
GO:0001503	Ossification	-4,5263	-1,565	9/381	PPARG,VGF,ZNF516,SLC27A1,SYK,ATP8B1,FXD3,CYB5R2,ANKH,ATP8B3,NRIP1
GO:0009409	Response to cold	-4,3285	-1,476	4/48	ATP8B1,FXD3,ATP2C2,ATP8B3
R-HSA-936837	Ion transport by P-type ATPases	-4,0334	-1,327	4/57	DUSP6,ETV1,ID2,PPARG,ZEB1,TRAF1,PRKAA2,CRTC1,AREG,EPHA4,VIM,C16orf45,NRIP1,AURKB,KLF4,CTHRC1
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	-3,9762	-1,296	6/180	COL7A1,FGF9,ID2,ZEB1,WNT7B,WNT10B,ZNF516,VIM,KLF4,SEMA3A,MYH15,GRHL2,COL13A1,PDGFC,ANKH,AREG,DUSP6,SEMA3C,TNS2,CTHRC1,DSC3,ELF3
GO:0061448	connective tissue development	-3,92335	-1,266	7/265	EPHA4,KLF4,RTN4RL1,DPYSL3,NT5E,PPARG,SEMA3A,SEMA3C,WNT10B,SYK
GO:0048679	Regulation of axon regeneration	-3,8823	-1,239	3/24	

Term	Description	LogP	Log(q-value)	InTerm_InList	Symbols
GO:0051781	Positive regulation of cell division	-3,3817	-0,959	4/84	FGF9,AURKB,PDGFC,MACC1,CDH1
GO:0048608	Reproductive structure development	-3,3793	-0,959	8/429	FGF9,PPARG,VGF,WNT7B,NRIP1,ADAM19,SEMA3A,GRHL2,AREG
GO:1900271	Regulation of long-term synaptic potentiation	-3,3505	-0,955	3/36	EPHA4,STAU1,CRTC1
GO:0034446	Substrate adhesion-dependent cell spreading	-3,3049	-0,943	4/88	EPHA1,TACSTD2,RAC3,UNC13D,CDH1,IL18,SYK,ADAM19,KLF4,ALOX5
GO:0048660	Regulation of smooth muscle cell proliferation	-3,1673	-0,835	5/168	FGF9,ID2,IL18,PPARG,KLF4,SYK,ZEB1,UNC13D

2.2 Article 2: Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle

Contribution des auteurs :

Pour cet article, j'ai effectué la majorité des expériences, incluant l'établissement de lignées cellulaires, la purification du fuseau, l'expression de mutants STAU1, les essais d'immunobuvardages, les préparations d'échantillons pour RNA-Seq, la microscopie confocale, l'imagerie à temps réel, les analyses par FACS, les essais de formation de colonies, ainsi que les courbes de croissance. Plus précisément, j'ai effectué l'ensemble de travaux pour les figures suivantes : Fig. 1; Fig. 2; Fig. 3; Fig. 7; Fig. S1; Fig. S2 A-B; Fig. S3; Fig. S4 A-D; Fig. S5 B; Fig. S6, Fig. S7, ainsi la Fig. 1 et la Fig. 2 de la discussion générale. J'ai également collaboré avec LP Benoit-Bouvrette pour illustrer les résultats obtenus par analyses bio-informatiques dans les figures suivantes : Fig. 5, A, D-F et Fig. S8. En ce qui concerne l'écriture, j'ai conçu la majorité des figures et j'ai rédigé initialement le manuscrit à l'exception de la discussion, elle a été écrite par Dr L. DesGroseillers L'article a été par la suite révisé principalement par Dr L. DesGroseillers et F. Bonnet-Magnaval. LP. Benoit-Bouvrette a contribué aux résultats obtenus par analyses bio-informatiques présentés dans la Fig. 5 A, D-F et la Fig. S8, les tableaux T1 et S1-7, ainsi qu'à la révision de l'ensemble du manuscrit. F. Bonnet-Magnaval était en charge des expériences de séquençage d'ADN génomiques, validation par RT-qPCR et vérification de la spécificité des anticorps. Les résultats obtenus sont présentés aux : Fig. 5 B-C; Fig. 6; Fig. S2 C-D; Fig. S4 E-F et Fig. S5 A. Bellastrid Doran a contribué par les résultats de la Fig. 4, ainsi qu'à la révision du manuscrit. M. Ghram, M. Bouthillette et Dr É. Lecuyer ont contribué à la révision du manuscrit.

Dr Luc DesGroseillers : Supervision générale et écriture/révision du manuscrit.

Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle

Sami Hassine^{1}, Florence Bonnet-Magnaval^{1*}, Louis-Philip Benoit-Bouvrette^{1,2}, Bellastrid Doran¹, Mehdi Ghram¹, Mathieu Bouthillette¹, Eric Lecuyer^{1,2}, and Luc DesGroseillers^{1,*}*

Journal of Cell Science (2020) 133, jcs247155

¹Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada¹;

²Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal, QC, H2W 1R7, Canada²

Running title: STAU1-dependent localization of RNAs on the mitotic spindle.

*** To whom correspondence should be addressed:**

Dr Luc DesGroseillers, Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit Montréal, QC, Canada. H3T 1J4. Phone: 514-343-5802. Fax: 514-343-2210. Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

* The first two authors should be regarded as Joint First Authors.

SUMMARY STATEMENT

Proper localization and functions of macromolecules during cell division are crucial to ensure survival and proliferation of daughter cells.

ABSTRACT

Staufen1 (STAU1) is an RNA-binding protein involved in the post-transcriptional regulation of mRNAs. We report that a large fraction of STAU1 localizes to the mitotic spindle in the colorectal cancer HCT116 and in the non-transformed hTERT-RPE1 cells. Spindle-associated STAU1 partly co-localizes with ribosomes and active sites of translation. We mapped the molecular determinant required for STAU1/spindle association within the first 88 N-terminal amino acids, a domain that is not required for RNA binding. Interestingly, transcriptomic analysis of purified mitotic spindles reveals that 1054 mRNAs as well as the precursor ribosomal RNA and lncRNAs and snoRNAs involved in ribonucleoprotein assembly and processing are enriched on spindles compared to cell extracts. STAU1 knockout causes the displacement of the pre-rRNA and of 154 mRNAs coding for proteins involved in actin cytoskeleton organization and cell growth, highlighting a role for STAU1 in mRNA trafficking to the spindle. These data demonstrate that STAU1 controls the localization of sub-populations of RNAs during mitosis and suggests a novel role of STAU1 in pre-rRNA maintenance during mitosis, ribogenesis and/or nucleoli reassembly.

KEYWORDS: Staufen1, RNA, localization, post-transcriptional regulation, mitotic spindle, RNA-Seq, ribosomal RNA.

INTRODUCTION

The localization of RNA molecules to specific subcellular compartments, a cellular mechanism that is crucial for the normal progression of several biological processes, functions to spatio-temporally regulate gene expression (1-3). Coordination of this post-transcriptional mechanism is controlled by RNA-binding proteins (RBPs) that are thought to bind and regulate overlapping groups of functionally related RNAs (4, 5). This mechanism may allow subpopulations of mRNAs to be tagged and functionally grouped into RNA regulons, and ensures that proteins involved in a specific pathway are translated in a highly coordinated fashion.

Staufen1 (STAU1) is a double-stranded RNA-binding protein well known for its involvement in the post-transcriptional regulation of gene expression (6, 7). It is ubiquitously expressed in mammals as alternatively spliced transcripts that generate protein isoforms of 55 kDa (STAU1⁵⁵, STAU1⁵⁵ⁱ) and 63 kDa (STAU1⁶³) (6-8). A large fraction of STAU1-bound mRNAs are associated with translating ribosomes (9-11). Genome-wide analyses reveal that STAU1-bound mRNAs code for proteins with heterogeneous functions including transcription, translation, cell growth and regulation of cell cycle (9, 10, 12-15). Through its binding to specific mRNA populations, STAU1 controls RNA splicing (16), nuclear export (16, 17), transport and localization (18, 19), translation (9, 10, 15, 20, 21), and decay (22, 23). STAU1, via the post-transcriptional regulation that it imposes to its bound mRNAs, regulates a wide range of physiologic transcripts and metabolic pathways. STAU1 is crucial for cell differentiation (22, 24-29), dendritic spine morphogenesis (19, 30), long-term synaptic plasticity (30), a cellular mechanism for long-term memory, response to stress (31), and cell proliferation (32). In addition, misregulation of STAU1-mediated post-transcriptional mechanisms of gene regulation accelerates cancer progression and regulates apoptosis (33-37).

Interestingly, STAU1 expression levels vary during the cell cycle (32). STAU1 levels rapidly decrease as cells transit through mitosis. Its degradation is mediated by the ubiquitin-proteasome system following its association with the E3 ubiquitin ligase anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) via its co-activators CDH1 and CDC20 (32). Therefore, modulation of STAU1 levels by cell cycle effectors may dictate the post-transcriptional expression of its bound transcripts and may contribute to the control of cell proliferation. Accordingly, a moderate overexpression of STAU1 in cancer cells impairs mitosis progression and cell proliferation (32, 38). Strikingly, STAU1 overexpression has no effect in non-transformed hTERT-RPE1 and IMR90 cells (32) indicating that the types and importance of cellular defects following a modulation of STAU1 levels depends on cellular contexts. Nevertheless, STAU1 is likely to play an important role during mitosis in non-transformed cells as well since its depletion impairs mitosis progression (39).

To understand the role of STAU1 during mitosis, we first documented its subcellular distribution, revealing that an important subpopulation of STAU1 associates with the mitotic spindle. Previous studies have shown that mRNAs can be found on mitotic spindles (40-46) but the mechanisms of their transport, localization and post-transcriptional regulation are unclear. We now show that STAU1 is involved in RNA localization on spindle. Using RNA-Seq analysis, we identified RNAs that are enriched on spindles, in particular the 45S pre-rRNA precursors and multiple mRNAs. Interestingly, the pre-rRNA and several mRNAs are delocalized from spindles in HCT116 STAU1-knockout (STAU1-KO) cells compared to wild type (WT) cells. Finally, we show that STAU1 partly colocalizes with O-propargyl-puromycin (OP-puromycin), a marker of active translation, on the mitotic spindles. Altogether, our results suggest that STAU1 regulates the

transport/localization of different RNA biotypes and that it may contribute to rRNA maintenance during mitosis and thus to nucleolus reassembly.

RESULTS

Localization of STAU1 to the mitotic spindle

To visualize the subcellular localization of STAU1 during mitosis, colorectal cancer HCT116 cells (Fig 1) and non-transformed hTERT-RPE1 cells (Supp Fig S1) were synchronized in late G₂ by the CDK1 inhibitor RO-3306 and then released from the block with fresh medium. At different time points post-release, cells were solubilized with Triton X100, then fixed and stained with anti-STAU1 and anti- α -tubulin antibodies. DAPI staining was included to visualize DNA. Confocal microscopy analysis of mitotic cells revealed that a significant subpopulation of STAU1 co-localized with α -tubulin on the mitotic spindles (Fig 1 A, B). During all phases of mitosis, STAU1 was observed at the poles of the spindle and also on fibers. During telophase, STAU1 was distributed in the cytoplasm of daughter cells and partly with the remains of polar spindle microtubules. Several controls were included to confirm the specificity of the antibodies (Supp Fig S2).

Biochemical characterization of the mitotic spindle

To confirm a tight association between STAU1 and components of the mitotic spindle, we biochemically purified spindles (Supp Fig S3A) and identified associated proteins by western blotting (Fig 2B; Supp Fig S3B). To prepare spindles, HCT116 and hTERT-RPE1 cells were synchronized in late G₂ and released. Mitotic cells were incubated with taxol (Fig 2A) to stabilize microtubules and harvested by shake-off. Purified spindles were observed by microscopy to control for the quality of the preparations (Supp Fig S3C). Western blot analysis showed that STAU1⁵⁵ co-purified with tubulin in spindle preparations of both cancer (Fig 2B) and non-transformed (Supp Fig S3B) cells. Interestingly, STAU1⁶³ isoform was not detected in the mitotic spindle fraction nor

the paralogue protein Staufen2 (STAU2). As expected, Aurora A, a known component of the spindle, was found in the spindle fraction while calnexin, β -actin and histone H3 used as negative controls were absent. As a further characterization of the spindle preparations, we showed that the ribosomal proteins S6 (RPS6) and L26 (RPL26) co-purified with spindles, suggesting that both the large and small subunits of the ribosomes, and thus the translation machinery, are present in spindle preparations.

dsRBD2 is necessary and sufficient to link STAU1⁵⁵ to spindles

As a first step to define how STAU1⁵⁵ binds to spindle components, we next evaluated the spindle targeting properties of STAU1 deletion mutants in order to map spindle association determinant. We first generated STAU1-KO HCT116 cell lines (Supp Fig S4A-F) that will prevent putative dimerization between exogenously expressed STAU1⁵⁵ mutants and endogenous STAU1 (47). The growth rate of STAU1-KO (clone CR1.3) HCT116 cells was similar to that of WT cells (Supp Fig 4D). We then showed that transiently expressed STAU1⁵⁵-HA₃ co-localized with spindles (Supp Fig S5A) and purified in spindle preparations (Supp Fig S5B) in STAU1-KO cells or in STAU1-control WT cells. Then, STAU1⁵⁵-HA₃ deletion mutants (Fig 3A) were expressed and their presence in the spindle fraction analyzed by western blotting (Fig 3B,C). As shown in figure 3B, mutants that lost RNA-binding activity (3*4*; Δ 3) (11) were present in the spindle fraction indicating that RNA binding activity is not required for spindle association. These results are consistent with our findings that STAU1⁵⁵ co-purified with spindles even when spindle preparations were treated with RNase prior to Western blotting (Supp Fig S6). Similarly, deletion of the tubulin-binding domain (Δ TBD) had no effect on the interaction with mitotic microtubules. Deletion of RBD4 (Δ 4) or RBD5 (Δ 5) had no consequence either. In contrast, a deletion that removed the first N-terminal 88 amino acids of STAU1⁵⁵-HA₃, corresponding to RBD2 (Δ 2),

reduced STAUI⁵⁵ association with mitotic spindles. The reverse experiment in which RBD2-HA₃ and RBD4-TBD-HA₃, used as control, were expressed in HCT116 STAUI-KO cells confirmed these results (Fig 4A-C): RBD2-HA₃ was found in the spindle fraction but not RBD4-TBD-HA₃. These results indicate that RBD2 is necessary and sufficient for STAUI/spindle association.

To more finely map the molecular determinant involved in STAUI⁵⁵/spindle association, progressive deletions were made in the N-terminal region and the resulting proteins were tested for their capacity to co-purify with spindles (Fig 4D-F). Western blotting of spindle-associated proteins showed that deletion of the first 25 residues (Δ 25) of STAUI⁵⁵ did not prevent STAUI⁵⁵ association with the spindle whereas deletion of the first 37 N-terminal residues (Δ 37) abrogated this association. These results indicate that the molecular determinant involved in STAUI⁵⁵/spindle association is located within amino acids 26 and 37.

Transcriptomes of WT and STAUI-KO cells

Given the well-established and conserved role of STAUI in the regulation of the post-transcriptional gene expression, it is likely that STAUI⁵⁵ is responsible for the transport and/or localization of specific RNAs to the spindle as well as for their post-transcriptional regulation while associated with this structure. Therefore, to highlight a putative role of STAUI⁵⁵ in the transport of RNAs to spindles, we biochemically purified mitotic spindles from parental WT and STAUI-KO cells and identified spindle-associated RNAs by RNA-Seq (Supp Table S1). Total RNAs from WT and STAUI-KO mitotic cells were also sequenced to normalize for putative changes in cell transcriptomes due to STAUI ablation. RNA Pico chips analysis showed the quality of RNA preparations (Supp Fig S7) and a PCA plot (48) showed that sequencing data are grouped together according to the sources of RNA preparations used (MS or IN) indicating reproducibility of the replicates (Supp Fig 8A). It also indicates that data from whole-cell RNA preparations are different

from those from mitotic spindle preparations. Similar conclusions were reached from the calculation of coefficients of correlation between samples (Supp Fig S8B-E).

Comparison of RNA biotypes in total cell extracts (Fig 5A) indicated that the relative expression of RNA types per million reads in the transcriptomes of WT and STAU1-KO cells is similar (Table 1). Almost half of the reads corresponded to protein-coding RNAs. Using FPKM of 1 as a threshold value for gene expression, only 108 individual RNAs were found to have altered expression in STAU1-KO cells compared to WT cells (fold change ≥ 2 , adjusted p-value ≤ 0.05) (Supp Table S1). 35 protein-coding mRNAs and four lncRNA were upregulated whereas 68 protein-coding mRNAs and one lncRNA were downregulated (Supp Table S2).

Genome-wide identification of mitotic spindle-enriched RNAs

A different pattern was observed with spindle preparations (Fig 5A, Table 1). The relative expression per million reads of protein-coding RNAs was higher in mitotic spindle preparations of STAU1-KO cells compared to WT cells whereas that of miRNAs and rRNAs were lower. Strikingly, the huge decrease of miRNAs and rRNAs is essentially due to three highly abundant RNAs in spindle preparations, RNA28S5, mir3648 and mir3687 (Table 1). Interestingly, the chromosomal location of mir3648 and mir3687 is within the RNA28S5 45S pre-rRNA locus (Fig 5B), suggesting that the two miRNA sequences are present in spindle preparations within the pre-rRNA transcript and not as mature miRNAs. This huge decrease in the number of reads (TPM) of rRNAs and miRNAs in STAU1-KO spindles compared to WT spindles results in a sur-representation of all other RNA biotypes, including protein-coding transcripts, in STAU1-KO spindle (Table 1). To confirm the presence of pre-rRNA in spindle preparations, we RT-qPCR-amplified spindle-associated RNAs with oligonucleotide primers positioned on either side of the 5'ETS/18S and ITS1/5.8S junctions (Fig 5B). Our results indicated that the spacer fragments were

linked to ribosomal sequences and therefore that the precursor rRNA is highly enriched in spindle preparations (Fig 5C). Sequences corresponding to mature 18S and 28S rRNAs were also very abundant in the spindle preparations, but they were not enriched compared to input because they are also present as abundant cytoplasmic ribosomes. These results indicate that the precursor 45S rRNA is an important component of the spindle transcriptome.

We then identified other spindle-enriched RNAs in WT cells. We plotted the amount of each RNA (FPKM) in the mitotic spindle preparations in function of their amount in total cell extracts (Fig 5D) and analyzed the frequency of RNAs in function of their enrichment in mitotic spindle preparations compared to cell extracts (Fig 5E). These results identified 1642 RNAs that are enriched at least twice (p -value $\leq 0,05$) in spindle preparations compared to total cell extracts, including 1054 protein-coding transcripts (Supp Table S3,S4). 28% of these mRNAs are known to bind STAUI (9, 10, 12, 15, 32). These mRNAs code for proteins involved in cellular processes such as cell differentiation, GTPase activity, microtubule-based processes, and chromatin organization and modification (Supp Table S5). In addition, the pre-rRNA as well as snoRNAs involved in pre-rRNA processing and MALAT1, a scaffold lncRNA involved in ribonucleoprotein assembly, were highly enriched (Supp Table S3).

STAUI⁵⁵-mediated Localization of RNAs on mitotic spindle

To identify RNAs whose localization to the spindle is dependent on STAUI, we compared the amount of individual RNA in spindle preparations of WT and STAUI-KO cells. We normalized the amount of each RNA in the spindle preparations to that in cell extracts (RNA-spindle/RNA-input) and then compared the ratios in STAUI-KO vs. WT cells. We identified 771 individual RNAs, including RNA28S5, miRNAs (including mir3648 and mir3687) and 154 protein-coding mRNAs whose amount in the spindle preparations is at least two-fold lower in STAUI-KO cells

than in WT cells (Fig 5F) (Supp Table S6). A different pattern appears with the analysis of TPM: the most important decrease concerns the pre-rRNA and its associated miRNAs while protein-coding transcripts represented only 2% of the total decreased reads (Fig 5F). 29.2% of the protein-coding mRNAs are known to bind STAUI. Among the remaining mRNAs that do not bind STAUI, 60% (60/109) are only marginally expressed (FPKM<2). Bioinformatic analysis (Metascape, A Gene Annotation & Analysis Resources (49)) indicates that the proteins encoded by these STAUI-bound mRNAs are enriched in GO terms related to regulation of cell shape, actin-cytoskeleton organization, negative regulation of cell growth and differentiation (Supp Table S7).

To confirm the STAUI-mediated differential association of RNAs with spindles of WT and KO cells, selected RNAs were quantified in cell extracts and spindle preparations of WT and STAUI-KO cells by RT-qPCR. Two different STAUI-KO cell lines, generated with different guide RNAs (Supp Fig S4), were used to exclude putative off-target effects. Based on RNA-Seq data, we studied several RNAs whose amounts were decreased in spindle preparations of STAUI-KO cells compared to that of WT cells and are known targets of STAUI binding. *Hprt* and *rpl22* mRNAs were used as negative controls to normalize data. As expected from RNA-Seq data, the 45S precursor rRNA was delocalized from the spindles of STAUI-KO cells compared to WT cells (Fig 6A) as well as *mex3d*, *fam101b* and *nat8l* mRNAs (Fig 6B). Used as control, the level of *aspm* RNA was unchanged in STAUI-KO spindle extracts compared to WT extracts.

STAUI⁵⁵ co-localizes with ribosomes and O-propargyl-puromycin on the mitotic spindle

The biochemical characterization of spindle-associated proteins indicated that ribosomal proteins co-purified with tubulin and STAUI⁵⁵ in spindle preparations (Fig 2). To study the link between ribosomes, spindles and STAUI⁵⁵, we documented their subcellular localization during mitosis (Fig 7). Using confocal microscopy, we first showed that a significant subpopulation of the

ribosomal protein S6 co-localized with tubulin (Fig 7A) and with STAU1 (Fig. 7B) on the mitotic spindle both at the poles and on fibers. Then, we treated cells with O-propargyl-puromycin, a marker of active translation (50). The signal was detected by confocal microscopy along with those generated by anti-tubulin and anti-STAU1 antibodies (Fig 7C). Our results indicated that foci of O-propargyl-puromycin co-localized with subpopulations of both tubulin and STAU1 on the mitotic spindle of individual cells.

DISCUSSION

In this paper, we show that STAU1⁵⁵ associates with the mitotic spindles in both transformed HCT116 and non-transformed hTERT-RPE1 cells. STAU1⁵⁵ is present in mitotic spindle preparations and co-localizes with tubulin and ribosomes on the mitotic spindle. This is consistent with previous large-scale proteomic studies that identified STAU1 as a spindle component of the human (51) and hamster (52) mitotic apparatus. In contrast, STAU1⁶³ was not found in spindle preparations. This was unexpected since the sequence of STAU1⁵⁵ is entirely included in that of STAU1⁶³ (6). It is likely that the additional amino acids at the N-terminus of STAU1⁵⁵ to generate STAU1⁶³ change the structure of the molecular determinant involved in STAU1⁵⁵ association with the spindle and make it inaccessible for protein interaction. Similarly, the paralog STAU2 is not associated with the spindle, consistent with recent observations that failed to localize STAU2 to mitotic spindle, although it co-localizes with spindle at meiosis I and II (53). The human paralogues independently evolved from an ancestor gene to acquire differential biological functions while keeping conserved molecular characteristics. Although the human paralogues are both RNA-binding proteins, they bind mainly different sets of mRNAs (12) and are essentially present in distinct ribonucleoprotein complexes (54). Accordingly, they play different roles in spines morphogenesis (30, 55) and synaptic activity (30, 56). Interestingly, in *Drosophila* embryos, Stauf protein moves to the pole of the mitotic spindles in close association with the astral microtubules when *bicoid* 3'UTR mRNA is injected (57).

Molecular determinant involved in STAU1⁵⁵-spindle association

STAU1 is a multifunctional protein with several determinants that control its molecular functions. Notably, RBD3 and RBD4 regulate STAU1 RNA-binding activity (6) and RBD4-TBD

is involved in ribosome association (11). We now show that STAU1 association with spindles requires the N-terminal region that contains RBD2, a domain devoid of RNA-binding activity in vitro (6), although we do not exclude the possibility that RBD2 could bind RNA in vivo as reported for the paralogue protein STAU2 (58). This result indicates that STAU1 RNA-binding and ribosome-binding activities are not involved in spindle association. It is interesting to note that deletion of the C-terminal RBD5 facilitates RBD2/spindle association (Fig 3 and 4). This is consistent with previous data showing an interaction between RBD2 and RBD5 (47) and indicates that RBD5 may regulate the functions of RBD2. RBD2 was also previously shown to bind CDC20 and CDH1 resulting in STAU1 ubiquitination and degradation during mitosis (32) and to be required for impaired cell proliferation (32). In addition, the region of RBD2 involved in STAU1-spindle association (aa 25-37) is also required to increase Pr55^{Gag} multimerization and HIV particle release (59) suggesting that HIV Gag may hijack STAU1 function to favor its own replication. Understanding the role of STAU1 on the mitotic spindle may be crucial not only to decipher new pathways leading to cell proliferation but also to discover new steps in RNA virus replication and therefore novel approaches to interfere with them.

The mechanism by which the N-terminal determinant (M²⁶RGGAYPPRYFY³⁷) allows STAU1⁵⁵ association with spindles is not known. Interestingly, in *Drosophila*, a proline-rich loop in dsRBD2 is required for the microtubule-dependent localization of *osk* mRNA but not for Staufen association with *osk* mRNA or for activation of its translation (60). It will be of interest to test if P32-P33 are involved in this process and/or if mutations that prevent tyrosine phosphorylation (Y35 and Y37) or arginine methylation (R27 and R34) (61) impair STAU1⁵⁵-spindle association. Alternatively, the N-terminal motif may recruit ubiquitin ligase through two potential ESCRT targeting domains (P³²PRY and Y³⁷PFVPPPL) that, in turn, targets the protein to the ESCRT

machinery. Interestingly, several ESCRT proteins localize to mitotic microtubules and play important roles throughout mitosis in centrosome localization and duplication, spindle organization and stability, kinetochore attachments, spindle checkpoint, nuclear envelope reassembly and cytokinesis (62-66).

Spindle-enriched RNAs

Large-scale RNA-Seq experiments identified RNAs that are enriched in spindle preparations compared to total cell extracts, including many protein-coding transcripts (Supp Table S3) (43). The fate of these transcripts is not clear. Although it is accepted that essential proteins required for mitosis are synthesized prior to prophase, several studies have shown that mitotic translation (41) and inhibition of cap-dependent translation (67) are important for proper mitotic progression. For example, active translation is needed from late prophase to prometaphase to synthesize proteins that determine the duration of mitosis exit (68). Large-scale ribosome profiling experiments confirmed that proteins are synthesized during mitosis (69-72). However, whether translation occurs on the spindle, in the cytoplasm or both is unknown.

The presence of ribosomes and of active sites of translation suggests that translation can occur on the spindle, consistent with the presence of several spindle-associated mRNAs in the lists of proteins that are translated during mitosis (72). Mitotic translation indeed contributes to the protein content of the mitotic apparatus (43). Consistently, depletion of several of these spindle-enriched mRNAs by RNA interference impairs normal spindle pole organization and γ -tubulin distribution (42), indicating that local translation of these mRNAs on the spindle is beneficial for mitosis progression. Interestingly, no correlation was established between the spindle enrichment of specific mRNAs and their translation on the spindle (42). Therefore, it was proposed that some

transcripts are spatially translated on spindles whereas others are translationally inactive cargos that are later segregated into daughter cells (43).

Strikingly, one of the most abundant RNAs on spindle is the RNA28S5 corresponding to the 45S pre-ribosomal RNA. This pre-rRNA is transcribed by RNA polymerase I from multiple 45S rDNA repeat units organized into five clusters on different chromosomes. During interphase, pre-rRNA is found in the nucleolus where it is processed to form mature 18S, 5.8S and 28S rRNAs and assembled into ribosomes (73). During prophase, the nucleolus is disassembles and rDNA transcription as well as pre-rRNA processing is arrested for the time of mitosis. The 45S pre-ribosomal RNA is maintained during mitosis and was shown to be present in the cytoplasm (74) and at the chromosome periphery together with pre-rRNA processing factors (74, 75). During telophase/early G₁, the nucleolus is reassembled and the mitosis-inherited 45S pre-rRNA is required for regulating the distribution of components to reassembling daughter cell nucleoli (76, 77). Our study now indicates that the pre-rRNA, as well as numerous snoRNAs involved in rRNA maturation, are associated with the mitotic spindle during mitosis allowing their segregation into the two daughter cells and reassembly of the nucleoli. The presence of the full-length pre-rRNA on spindle contrasts with previous observation in the clam *Spisula* that only the processed rRNA spacers, but not the full-length precursor, are associated with centrosomes during meiosis (78).

STAU1⁵⁵-dependent Localization of mRNAs on the mitotic spindle

Using WT and STAU1-KO cells, we identified RNAs that are delocalized from the spindle when STAU1 is depleted. Since their overall expression in total cell extracts is not changed in STAU1-KO compared to wild-type cells, these results indicate that STAU1⁵⁵ is responsible for the transport/localization of RNA populations to the spindle. Strikingly, the 45S pre-rRNA accounts for most of the reduced reads that are observed in STAU1-depleted cells, revealing a novel role for

STAU1⁵⁵ in nucleolus functions and reassembly. STAU1 was previously shown to be associated with ribosomes (11) and to enhance translation when bound to the 5'UTR of mRNAs (20). In addition, STAU1 was shown to transit through the nucleolus where it is thought to be involved in ribosome and/or ribonucleoprotein biogenesis (79). Our results now add an additional putative role of STAU1 in pre-rRNA trafficking during mitosis and nucleolus reassembly in daughter cells.

Trafficking of other RNA populations is also altered in STAU1-KO cells. The number of different protein-coding transcripts represents a relatively small percentage of delocalized RNA molecules (20%) and only 2% of the delocalized reads. We believe that this is an under-representation of the number of delocalized STAU1-bound transcripts due to the incorporation of additional reads required to compensate the huge decrease of rRNA (TPM) in STAU1-KO spindles compared to WT spindles. The fate of these mRNAs on spindle is unknown. It is likely that a subpopulation of mRNAs on spindle is locally transcribed. Another subpopulation of STAU1-bound mRNAs is likely sequestered to the spindle in a translationally inactive form, and subsequently released and translated during G₁. Consistently, large-scale ribosomal profiling (69-71) of G₂, M and G₁ synchronized cells identified over 300 mRNAs whose translation is up- or down-regulated during mitosis vs. G₁ or G₂ while the amounts of their corresponding mRNAs remained unchanged. At least 18 of the 154 mRNAs shown to be delocalized from the mitotic spindle in Stau1 KO cells were among those whose translation is regulated. Interestingly, all of them but one show reduced translation during mitosis. Strikingly, 14 of these 18 mRNAs are known targets of STAU1, suggesting that STAU1 may be a critical factor in a mechanism of translation inhibition during mitosis.

Thus, STAU1 controls, in different cellular compartments, different sub-populations of pre-rRNAs and mRNAs that likely regulate cell decision during mitosis. Via the post-

transcriptional regulation that it imposes to its bound RNAs, STAU1 regulates crucial functions and deregulation of this mechanism may explain the proliferation defects observed in non-transformed cells upon STAU1 depletion (39).

MATERIAL AND METHODS

Plasmids and reagents

Plasmids coding for STAU1^{Δ2}-HA₃, STAU1^{Δ3}-HA₃, STAU1^{Δ4}-HA₃, STAU1^{Δ5}-HA₃, STAU1^{ΔTBD}-HA₃, STAU1^{3*-4*}-HA₃, STAU1^{Δ25}-HA₃, STAU1^{Δ37}-HA₃, as well as RBD2-HA₃ and RBD4-TBD-HA₃ were previously described (6, 11, 32, 47, 59). Monoclonal (1/1000) and rabbit (1/1000) anti-STAU1 antibodies were previously described (20, 80), respectively. Anti-β-actin (A5441, clone AC-74. 1/5000), anti-STAU2 (HPA0191551/500), anti-α-tubulin (T6074, batch number 023M4813. 1/40000), and anti-HA (H6908, batch number 115M4872v. 1/1000) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-aurora A (30925, batch number 2. 1/2000), anti-α-tubulin (for IF, ab18251, batch number GR201260-1. 1/40000) and anti-histone H3 (ab1791, batch number GR204148-1. 1/3000) antibodies were purchased from Abcam. Anti-calnexin (sc-11397, batch number C1214. 1/1000) antibody was obtained from Santa Cruz. Anti-RPS6 (2212, batch number 4. 1/1000) was purchased from Cell Signaling. Anti-RPL26, (GTX101833. 1/1000) and anti-STAU1 (for IF, GTX106566. 1/200) was obtained from Genetex. Goat polyclonal anti-mouse (p0447, batch number 20051789. 1/3000) and anti-rabbit (p0448, batch number 20017525. 1/5000) antibodies were purchased from Dako.

Cell culture

The human cell lines hTERT-RPE1 and HCT116 were obtained from ATCC (Manassas, USA). Human colorectal HCT116 cells and STAU1-KO CRISPR-derived clones were cultured in McCoy's medium with 10% fetal bovine serum, 20 mM glutamine and 1% penicillin–streptomycin (Wisent). The human cell line hTERT-RPE1 was cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) or fetal bovine

serum (Wisent), 100 µg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin (Wisent). Cells were cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere.

STAU1-KO HCT116 cell lines

STAU1-KO HCT116 cells were generated by the CRISPR/Cas9 technology (81). Briefly, HCT116 cells were transfected with plasmid coding for GFP, Cas9 and a sgRNA targeting exon 5 of the *STAU1* gene (Horizon Discovery), using Lipofectamine 3000 (Life Technologies/Thermo Fisher). Forty-eight hours post-transfection, GFP positive cells were sorted by FACS and individual cells were grown into 96-well plates until colonies formed. Loss of STAU1 expression was monitored by western blotting using anti-STAU1 antibody. For growth curve assays, cells were harvested every day and the number of cells was counted with an automatic cell counter TC20 (Bio-Rad). The STAU1-KO clone CR1.3 was used in all experiments requiring STAU1 depletion. Clone CXR2.9 was used in the RT-qPCR experiment.

Cell lysates and immunoblotting

Cells were harvested in phosphate buffered saline (PBS) and lysed in Tris-SDS Buffer (250 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 5% (w/v) SDS, 100 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore). Membranes were blocked for 1 hour in PBST (1× PBS, 0.05% Tween 20) containing 5% non-fat dry milk. Primary antibodies were prepared in 1% (w/v) skim milk in PBS-Tween20 (0,2%) and 0,1% (w/v) sodium azide. Membranes were incubated at room temperature with antibodies for one hour or 16 h (anti-STAU2). Secondary antibodies were prepared in 2,5% (w/v) skim milk in PBS-Tween20

(0,2%). Membranes were incubated at room temperature for 1 h with polyclonal goat anti-mouse (Dako) or anti-rabbit (Dako) HRP-conjugated secondary antibodies. Antibody-reactive bands were detected with chemiluminescence substrate ECL kit (GE Healthcare) using ChemiDoc™ MP Systems (Bio-Rad) or X-ray films (Fujifilm).

OP-puromycin

Active sites of translation were visualized with the Click-iT® Plus OPP Protein Synthesis Assay Kit (Thermofisher) as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were incubated with 20 µM Click-iT OPP solution for 30 min, fixed in 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min and permeabilized in 0.5% Triton X100 for 15 min. OPP was detected with Click-iT Plus OPP reaction cocktail. Images were acquired with an inverted Axio Observer Z1 confocal spinning disk microscope (ZEISS). Images were processed with the Zen elite blue edition or ImageJ software.

Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded onto poly-L-lysine-treated 20 mm coverslips in a six-well plate at 40% confluence and incubated overnight at 37°C. Cells were permeabilized in 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.7), 0.5% Triton-X-100 (v/v) and 0.1% BSA (w/v) for 5 minutes and then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. Fixed cells were washed thrice in PBS and blocked in PBS containing 0.1% BSA, 0.02% sodium azide and 1% goat serum for one hour at room temperature. Cells were immuno-stained in blocking buffer containing antibodies for 16h at 4°C. Secondary fluorochrome-conjugated antibodies (AlexaFluor 488 goat anti-mouse, AlexaFluor 488 goat anti-rabbit, AlexaFluor 568 goat anti-mouse, or AlexaFluor 568 goat anti-rabbit (Molecular Probes-Invitrogen) were added for 1h at room temperature. Coverslips were washed and mounted on glass slides using ProLong™ Diamond Antifade mountant media

(Thermofisher) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were acquired with an inverted Axio Observer Z1 confocal spinning disk microscope (ZEISS). Images processing was performed using Zen elite blue edition or ImageJ software.

Mitotic spindle preparation

Mitotic spindles were prepared from mitosis synchronized cells essentially as described [43]. Briefly, mitotic cells were synchronized in late G2 with RO-3306, released and incubated in the presence of taxol (100 μ M) for 15 min to stabilize polymerized microtubule. Mitotic cells were collected by shake-off and cell extracts were diluted in lysis buffer (100 mM Pipes, pH 6.8, 1 mM MgSO₄, and 2 mM EGTA, 4 μ g/mL taxol, 2 μ g/mL latrunculin B, 0.5% NP-40, 200 μ g DNase 1, 1 U/mL micrococcal nuclease, 20 U/mL benzonate, protease and phosphatase inhibitor cocktails) and centrifuged for two min at 700 g. The microtubule pellet was dissolved in hypotonic buffer (1mM PIPES, 5 μ g/mL taxol) and centrifuged again at 1500 g for three minutes to obtain purified mitotic spindle. Micrococcal nuclease was omitted when spindle-associated RNAs were purified.

Genomic DNA sequencing

Genomic DNA was isolated (Bio Basic) and PCR-amplified using the Phusion polymerase (NEB) and specific primers flanking exon 5 of the *STAU1* gene (sense: 5' AGCCAAGTTTTGTCTCAGCC 3'; antisense: 5' ACAGCTGTCAATGTGCCTTCT 3'). PCR products were cloned into a pBluescript SK (+) vector (Stratagene). Ten clones were randomly chosen and sequenced (Genome Québec).

RNA extraction and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using TRIZOL Reagent (Invitrogen) and reverse transcribed into cDNA using the RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase Thermo Scientific™ Kit (Thermo Fisher Scientific). RNA was resuspended in 20 µL water and digested with DNaseI using amplification grade AMPD1 kit (Sigma-Aldrich) prior to reverse transcription. Reverse transcription reactions were done with 1 µg RNA, MuLV RT enzyme and random hexamer (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer protocol. Resulting cDNAs were qPCR amplified using the Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master kit and the LightCycler® 480 instrument (Roche Applied Science). Cycling conditions were set at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, and 45 cycles. Sense and antisense primers were respectively: ASPM, 5'-GCACCTTTCTGCCATTCTTGAGG-3' and 5'-TGCTCCACTCTGGGCCATGT-3'; MEX3D, 5'-CAGATGAGCGTGATCGGCA-3' and 5'-TGTTTGTCTTGGCCCGCAG-3'; FAM101B, 5'-GGCTTTGTCCCCTGTCCTTT-3' and 5'-GCCTCTCGGAGTCGTA CTTG-3'; NAT8L, 5'-CGCTACTACTACAGCCGCAAG-3' and 5'-CACAATGCCACACGTTGC-3'; HPRT, 5'-GCTTTCCTTGGTCAGGCAGT-3' and 5'-CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC-3'; RPL22, 5'-TGGTGACCATCGAAAGGAGCAAGA-3' and 5'-TTGCTGTTAGCAACTACGCGCAAC-3'; ETS-18S, 5'-CGCCGCGCTCTACCTTACC-3' and 5'-CGAGCGACCAAAGGAACCAT-3'; ITS1-5.8S, 5'-CTCGCCAAATCGACCTCGTA-3' and 5'-GCAAGTGCGTTCGAAGTGTC-3'.

RNA-Seq and Differential gene expression analysis

HCT116 were lysed in Trizol reagent (Life technologies) and RNA extracted. TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to eliminate DNA contamination and RNA was purified with RNeasy mini kit (Qiagen). Ribosomal RNA sequences were removed with the RiboMinus Eukaryote kit for RNA-Seq (ThermoFisher). RNA-Seq libraries were prepared using TruSeq stranded total RNA sample preparation kit (Illumina). Read quality was assessed using FastQC. No trimming was deemed necessary. Read alignment was executed using TopHat on the Human GRCh37 genomes from Ensembl (82). The GTF annotation file used during the alignment and for counting the number of reads aligned to each feature was also downloaded from Ensembl (release 75). Read count was obtained with featureCounts (83). Normalized count values (FPKM) and differential expression was computed with DESeq2 (84). Gene biotypes and additional information were obtained via the biomaRt R library (85). All correlations and analysis were performed using R. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (86) and are accessible through GEO Series accession number GSE138441 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE138441>).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Louise Cournoyer in the cell culture facility in the Département de biochimie et médecine moléculaire. We thank the molecular biology and functional genomics core facilities (Odile Neyret, Alexis Blanchet-Cohen) at the Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM) and the gene expression analysis core facilities at Genome Quebec Innovation Centre (McGill University) for transcriptomics approaches.

COMPETING INTEREST

No competing interests declared.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research [MOP-229979 to LDG]; and the Bristol-Myers-Squibb chair in molecular biology to LDG.

DATA AVAILABILITY

The data discussed in this publication have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE138441.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary information available online at

<https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.247155.supplemental>

REFERENCES

1. Neriec N, Percipalle P. Sorting mRNA Molecules for Cytoplasmic Transport and Localization. *Front Genet.* 2018;9:510.
2. Suter B. RNA localization and transport. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018;1861(10):938-51.
3. Mayya VK, Duchaine TF. Ciphers and Executioners: How 3'-Untranslated Regions Determine the Fate of Messenger RNAs. *Front Genet.* 2019;10:6.
4. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet.* 2007;8(7):533-43.
5. Van Nostrand EL, Pratt GA, Yee BA, Wheeler E, Blue SM, Mueller J, et al. Principles of RNA processing from analysis of enhanced CLIP maps for 150 RNA-binding proteins. *bioRxiv* 2020;807008.
6. Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology.* 1999;19(3):2220-30.
7. Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology.* 1999;19(3):2212-9.
8. Duchaine T, Wang HJ, Luo M, Steinberg SV, Nabi IR, DesGroseillers L. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Molecular and cellular biology.* 2000;20(15):5592-601.
9. Ricci EP, Kucukural A, Cenik C, Mercier BC, Singh G, Heyer EE, et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nature structural & molecular biology.* 2014;21(1):26-35.
10. de Lucas S, Oliveros JC, Chagoyen M, Ortin J. Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic acids research.* 2014;42:4516-26.
11. Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal.* 2002;365(Pt 3):817-24.
12. Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, NY).* 2008;14(2):324-35.
13. Laver JD, Li X, Ancevicus K, Westwood JT, Smibert CA, Morris QD, et al. Genome-wide analysis of Staufen-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic acids research.* 2013;41(20):9438-60.
14. LeGendre JB, Campbell ZT, Kroll-Conner P, Anderson P, Kimble J, Wickens M. RNA targets and specificity of Staufen, a double-stranded RNA-binding protein in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(4):2532-45.

15. 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;519(7544):491-4.
16. Ravel-Chapuis A, Belanger G, Yadava RS, Mahadevan MS, DesGroseillers L, Cote J, et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology*. 2012;196(6):699-712.
17. 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 & development*. 2013;27(13):1495-510.
18. Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, et al. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(1):288-97.
19. Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, et al. A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16374-9.
20. Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Moulard AJ, DesGroseillers L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic acids research*. 2005;33(15):4797-812.
21. Jeong K, Ryu I, Park J, Hwang HJ, Ha H, Park Y, et al. Staufen1 and UPF1 exert opposite actions on the replacement of the nuclear cap-binding complex by eIF4E at the 5' end of mRNAs. *Nucleic acids research*. 2019;47(17):9313-28.
22. 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;120(2):195-208.
23. Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, DesGroseillers L, Maquat LE. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal*. 2007;26(11):2670-81.
24. Belanger G, Stocksley MA, Vandromme M, Schaeffer L, Furic L, DesGroseillers L, et al. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(3):669-77.
25. Gautrey H, McConnell J, Lako M, Hall J, Hesketh J. Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783(10):1935-42.
26. Yamaguchi Y, Oohinata R, Naiki T, Irie K. Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2008;13(6):583-92.
27. Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development*. 2009;23(1):54-66.
28. Kretz M. TINCR, staufen1, and cellular differentiation. *RNA biology*. 2013;10(10):1597-601.

29. Cho H, Kim KM, Han S, Choe J, Park SG, Choi SS, et al. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Molecular cell*. 2012;46(4):495-506.
30. 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. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(9):2896-907.
31. Thomas MG, Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 4):563-73.
32. Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trepanier V, Mollet S, Frechina C, et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic acids research*. 2014;42(12):7867-83.
33. Xu TP, Liu XX, Xia R, Yin L, Kong R, Chen WM, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene*. 2015;34(45):5648-61.
34. Xu TP, Wang YF, Xiong WL, Ma P, Wang WY, Chen WM, et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell death & disease*. 2017;8(6):e2837.
35. Liu Z, Chen Z, Fan R, Jiang B, Chen X, Chen Q, et al. Over-expressed long noncoding RNA HOXA11-AS promotes cell cycle progression and metastasis in gastric cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):82.
36. 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. *Nature communications*. 2016;7:13875.
37. Sakurai M, Shiromoto Y, Ota H, Song CZ, Kossenkov AV, Wickramasinghe J, et al. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*. 2017;24(6):534-43.
38. Wan D, Gong Y, Qin W, Zhang P, Li J, Wei L, et al. Large-scale cDNA transfection screening for genes related to cancer development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15724-9.
39. Ghram M, Bonnet-Magnaival, F., Hotea, D.I., Doran, B., Ly, S., and DesGroseillers, L. Staufen1 is essential for cell cycle transitions and cell proliferation via the control of E2F1 expression. *Journal of Molecular Biology*. 2020.
40. Eliscovich C, Peset I, Vernos I, Mendez R. Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nature cell biology*. 2008;10(7):858-65.
41. 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;103(3):435-47.
42. Sharp JA, Plant JJ, Ohsumi TK, Borowsky M, Blower MD. Functional analysis of the microtubule-interacting transcriptome. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(22):4312-23.

43. Blower MD, Feric E, Weis K, Heald R. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *The Journal of cell biology*. 2007;179(7):1365-73.
44. Sepulveda G, Antkowiak M, Brust-Mascher I, Mahe K, Ou T, Castro NM, et al. Co-translational protein targeting facilitates centrosomal recruitment of PCNT during centrosome maturation in vertebrates. *eLife*. 2018;7.
45. Kingsley EP, Chan XY, Duan Y, Lambert JD. Widespread RNA segregation in a spiralian embryo. *Evolution & development*. 2007;9(6):527-39.
46. Hussain S, Benavente SB, Nascimento E, Dragoni I, Kurowski A, Gillich A, et al. The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *The Journal of cell biology*. 2009;186(1):27-40.
47. Martel C, Dugre-Brisson S, Boulay K, Breton B, Lapointe G, Armando S, et al. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA (New York, NY)*. 2010;16(3):585-97.
48. Khatua S, Peterson KM, Brown KM, Lawlor C, Santi MR, LaFleur B, et al. Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. *Cancer research*. 2003;63(8):1865-70.
49. Tripathi S, Pohl MO, Zhou YY, Rodriguez-Frandsen A, Wang GJ, Stein DA, et al. Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe*. 2015;18(6):723-35.
50. Chao JA, Yoon YJ, Singer RH. Imaging translation in single cells using fluorescent microscopy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11).
51. Rao SR, Flores-Rodriguez N, Page SL, Wong C, Robinson PJ, Chircop M. The Clathrin-dependent Spindle Proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2016;15(8):2537-53.
52. Bonner MK, Poole DS, Xu T, Sarkeshik A, Yates JR, 3rd, Skop AR. Mitotic spindle proteomics in Chinese hamster ovary cells. *PloS one*. 2011;6(5):e20489.
53. Cao Y, Du J, Chen D, Wang Q, Zhang N, Liu X, et al. RNA-binding protein Stau2 is important for spindle integrity and meiosis progression in mouse oocytes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2016;15(19):2608-18.
54. Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 16):3285-95.
55. Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, et al. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 2006;172(2):221-31.
56. Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, et al. Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*. 2011;18(5):314-26.
57. Ferrandon D, Elphick L, Nusslein-Volhard C, St Johnston D. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell*. 1994;79(7):1221-32.

58. Heber S, Gaspar I, Tants JN, Gunther J, Moya SMF, Janowski R, et al. Staufen2-mediated RNA recognition and localization requires combinatorial action of multiple domains. *Nat Commun.* 2019;10(1):1659.
59. Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, Desgroseillers L. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology.* 2008;5:41.
60. Micklem DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *The EMBO journal.* 2000;19(6):1366-77.
61. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research.* 2015;43(Database issue):D512-20.
62. Dionisio-Vicuna MN, Gutierrez-Lopez TY, Adame-Garcia SR, Vazquez-Prado J, Reyes-Cruz G. VPS28, an ESCRT-I protein, regulates mitotic spindle organization via Gbetagamma, EG5 and TPX2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(7):1012-22.
63. Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WI. Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(29):12889-94.
64. Petsalaki E, Dandoulaki M, Zachos G. The ESCRT protein Chmp4c regulates mitotic spindle checkpoint signaling. *The Journal of cell biology.* 2018;217(3):861-76.
65. Petsalaki E, Zachos G. Novel ESCRT functions at kinetochores. *Aging (Albany NY).* 2018;10(3):299-300.
66. Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, et al. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature.* 2015;522(7555):231-5.
67. Wilker EW, van Vugt MA, Artim SA, Huang PH, Petersen CP, Reinhardt HC, et al. 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature.* 2007;446(7133):329-32.
68. Cummins JE, Blomquist JC, Rusch HP. Anaphase delay after inhibition of protein synthesis between late prophase and prometaphase. *Science.* 1966;154(3754):1343-4.
69. Stumpf CR, Moreno MV, Olshen AB, Taylor BS, Ruggero D. The Translational Landscape of the Mammalian Cell Cycle. *Molecular cell.* 2013;52(4):574-82.
70. Tanenbaum ME, Stern-Ginossar N, Weissman JS, Vale RD. Regulation of mRNA translation during mitosis. *eLife.* 2015;4.
71. Park JE, Yi H, Kim Y, Chang H, Kim VN. Regulation of Poly(A) Tail and Translation during the Somatic Cell Cycle. *Molecular cell.* 2016;62(3):462-71.
72. Aviner R, Geiger T, Elroy-Stein O. Novel proteomic approach (PUNCH-P) reveals cell cycle-specific fluctuations in mRNA translation. *Genes & development.* 2013;27(16):1834-44.
73. Hernandez-Verdun D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus.* 2011;2(3):189-94.

74. Shishova KV, Zharskaya CO, Zatsepina CO. The Fate of the Nucleolus during Mitosis: Comparative Analysis of Localization of Some Forms of Pre-rRNA by Fluorescent in Situ Hybridization in NIH/3T3 Mouse Fibroblasts. *Acta Naturae*. 2011;3(4):100-6.
75. Sirri V, Jourdan N, Hernandez-Verdun D, Roussel P. Sharing of mitotic pre-ribosomal particles between daughter cells. *Journal of cell science*. 2016;129(8):1592-604.
76. Carron C, Balor S, Delavoie F, Plisson-Chastang C, Faubladiere M, Gleizes PE, et al. Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 19):4532-42.
77. Dundr M, Misteli T, Olson MO. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *The Journal of cell biology*. 2000;150(3):433-46.
78. Alliegro MC, Alliegro MA. Localization of rRNA transcribed spacer domains in the nucleolus and maternal procentrioles of surf clam (*Spisula*) oocytes. *RNA biology*. 2013;10(3):391-6.
79. Martel C, Macchi P, Furic L, Kiebler MA, Desgroseillers L. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *The Biochemical journal*. 2006;393(Pt 1):245-54.
80. Rao S, Hassine S, Monette A, Amorim R, DesGroseillers L, Mouland AJ. HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles. *RNA (New York, NY)*. 2019;25(6):727-36.
81. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6096):816-21.
82. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*. 2012;7(3):562-78.
83. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.
84. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*. 2010;11(10):R106.
85. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*. 2009;4(8):1184-91.
86. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*. 2002;30(1):207-10.

TABLE**Table 1-Total number of individual transcripts and of transcripts per million (TPM) across RNA biotypes.**

Biotype	Number	TPM			
		MS-CR1.3	MS-WT	IN-CR1.3	IN-WT
lncRNA	2 549	177 538	132 034	224 053	256 876
miRNA	711	137 876	313 748	10 511	10 185
misc_RNA	395	71 640	58 060	219 190	237 103
Prot-coding	11 782	449 509	247 028	497 031	449 242
pseudogene	1 545	16 440	10 274	11 315	10 531
rRNA	19	64 205	170 341	8 024	8 372
snoRNA	361	64 869	55 563	23 091	21 775
snRNA	414	16 651	11 771	5 718	5 314
tRNA	22	1 269	1 178	1 063	596
RNA28S5	1	62 906	168 792	6 030	6 090
mir3648	1	45 624	138 997	3 033	3 562
mir3687	1	85 280	168 002	3 869	3 828

Number: number of individual RNA

TPM: transcripts per million

MS: mitotic spindle

IN: input (total mitotic cell extract)

CR1.3: STAU1-KO HCT116 cells (clone CR1.3)

WT: wild type HCT116 cells

FIGURES

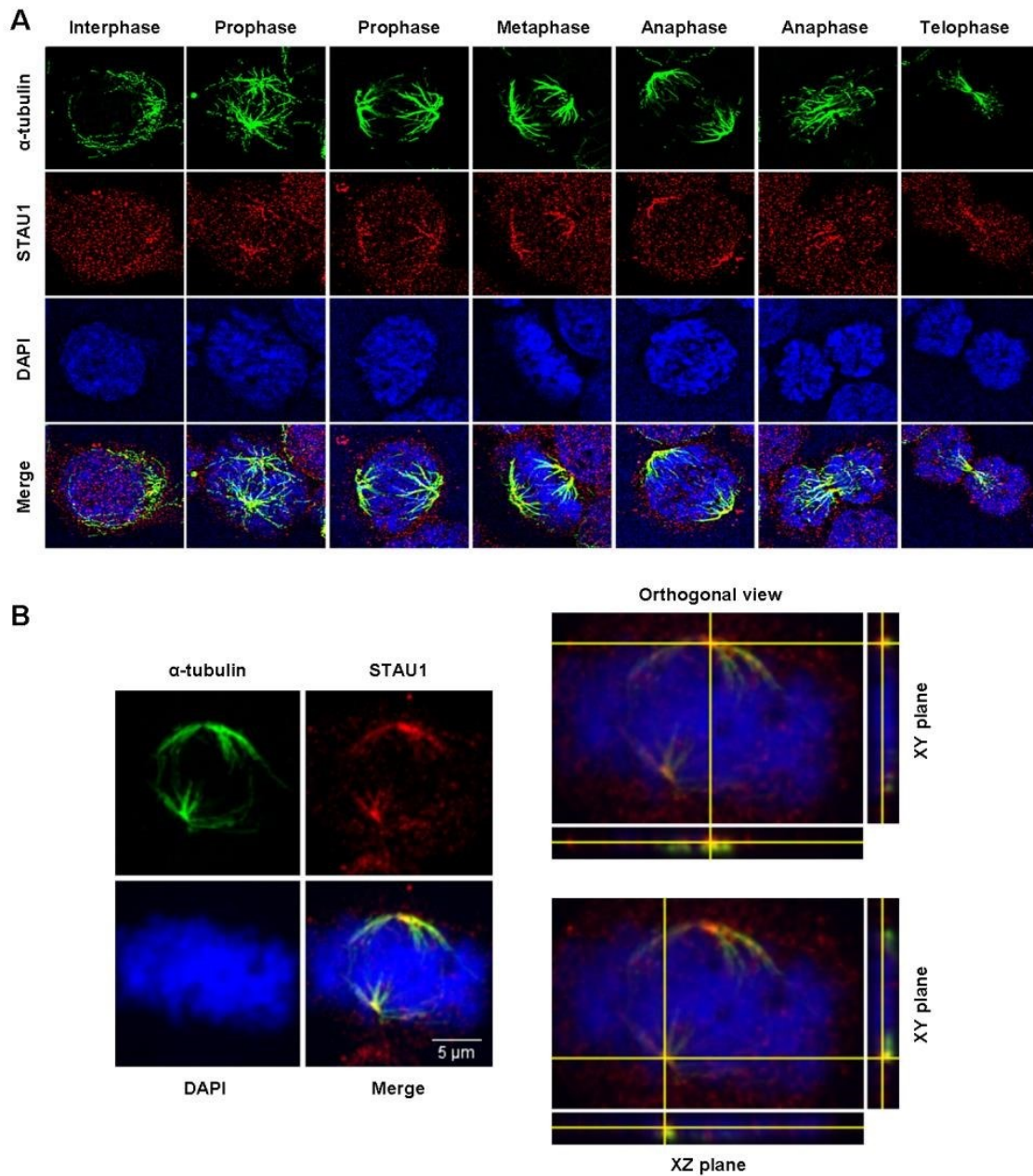


Figure 1 - Localization of STAU1 on the mitotic spindle

HCT116 cells were synchronized in late G2 with the CDK1 inhibitor RO-3306 and released from the block to reach mitosis. Mitotic spindle microtubules were stabilized by Taxol. Cells were

solubilized with Triton X-100 before fixation to remove soluble material. (A) Confocal images of cells stained with antibodies against STAU1 and α -tubulin. DNA was stained with DAPI. Cells at different stages of mitosis are shown. This figure is representative of multiple experiments done by three different experimenters. STAU1 localization on spindle was observed in all mitotic cells. (B) Left panel: Confocal images of cells stained with antibodies against STAU1 and α -tubulin to visualize STAU1 and mitotic spindles. DNA was stained with DAPI. Right panels: 3D-analysis of the relative position of STAU1 and α -tubulin on microtubules shows co-localization of the proteins in space.

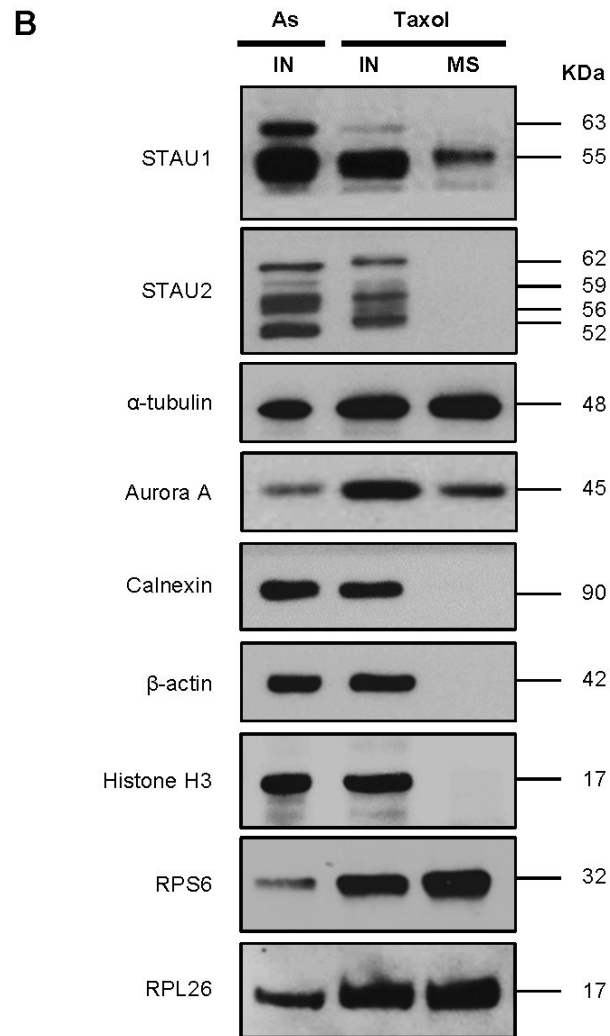
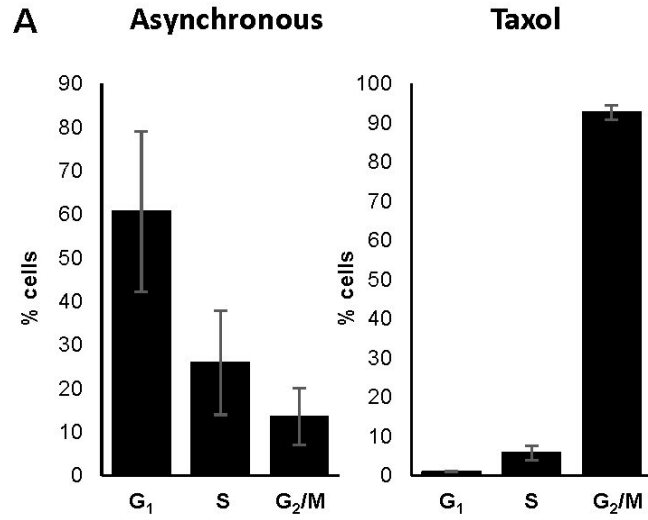


Figure 2 - Co-purification of STAU1 with mitotic spindle proteins

(A) Cell cycle distribution of unsynchronized (Asynchronous) and taxol-synchronized (Taxol) cells was determined by FACS analysis. (p -value $\leq 0,05$; $n = 3$). (B) Western blot analysis of purified mitotic spindles (MS) using specific antibodies. Total input lysates (IN) from asynchronous (As) and taxol-synchronized (Taxol) cells were loaded as controls. This figure is representative of three independently performed experiments.

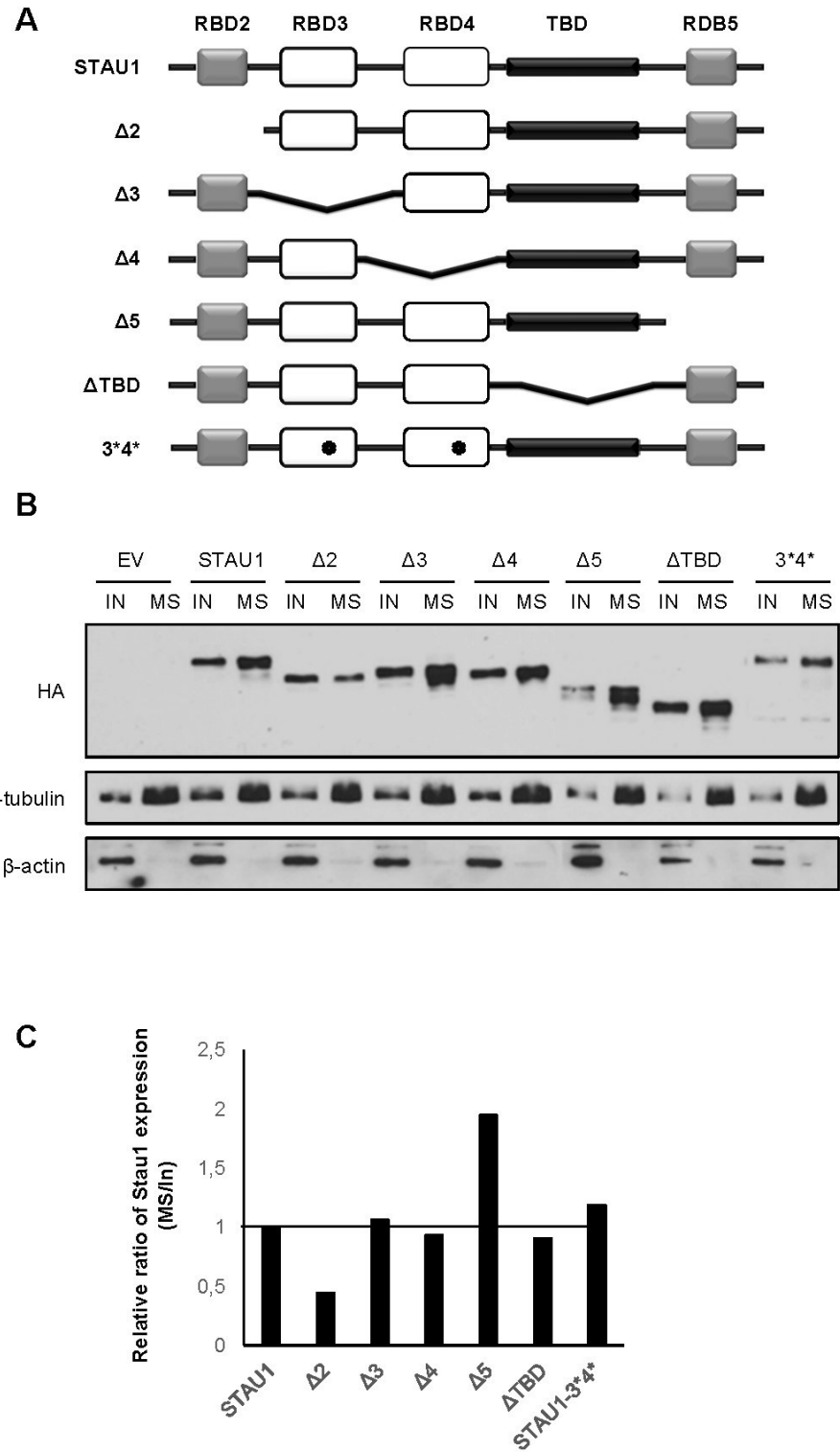


Figure 3 - Mapping of the molecular determinant involved in STAU1-spindle association

STAU1-KO HCT116 cells were transfected with plasmids coding for HA₃-tagged STAU1 WT or deletion mutants (Δ) to map the molecular determinant involved in the binding of STAU1 to the mitotic spindle. (A) Schematic representation of STAU1 WT and mutants. *, point mutation that abolishes STAU1 RNA-binding activity. RBD: RNA-binding domain. TBD, tubulin-binding domain. White boxes, RNA-binding domains. Grey boxes, domains that do not bind RNA in vitro although they have the consensus sequence for RNA-binding. Black boxes, tubulin-binding domains. (B) Cells were synchronized in mitosis with taxol. Proteins from the total cell extracts (IN) and from purified spindle preparations (MS) were analyzed by western blotting. Proteins were identified with specific antibodies as indicated. (C) Quantification of STAU1 proteins on the mitotic spindle. The ratio of STAU1 amounts in the spindle preparations over that in the total mitotic cell extracts was calculated. The ratio obtained for STAU1 WT was arbitrary fixed to 1. These data are representative of two independently performed experiments that gave similar results.

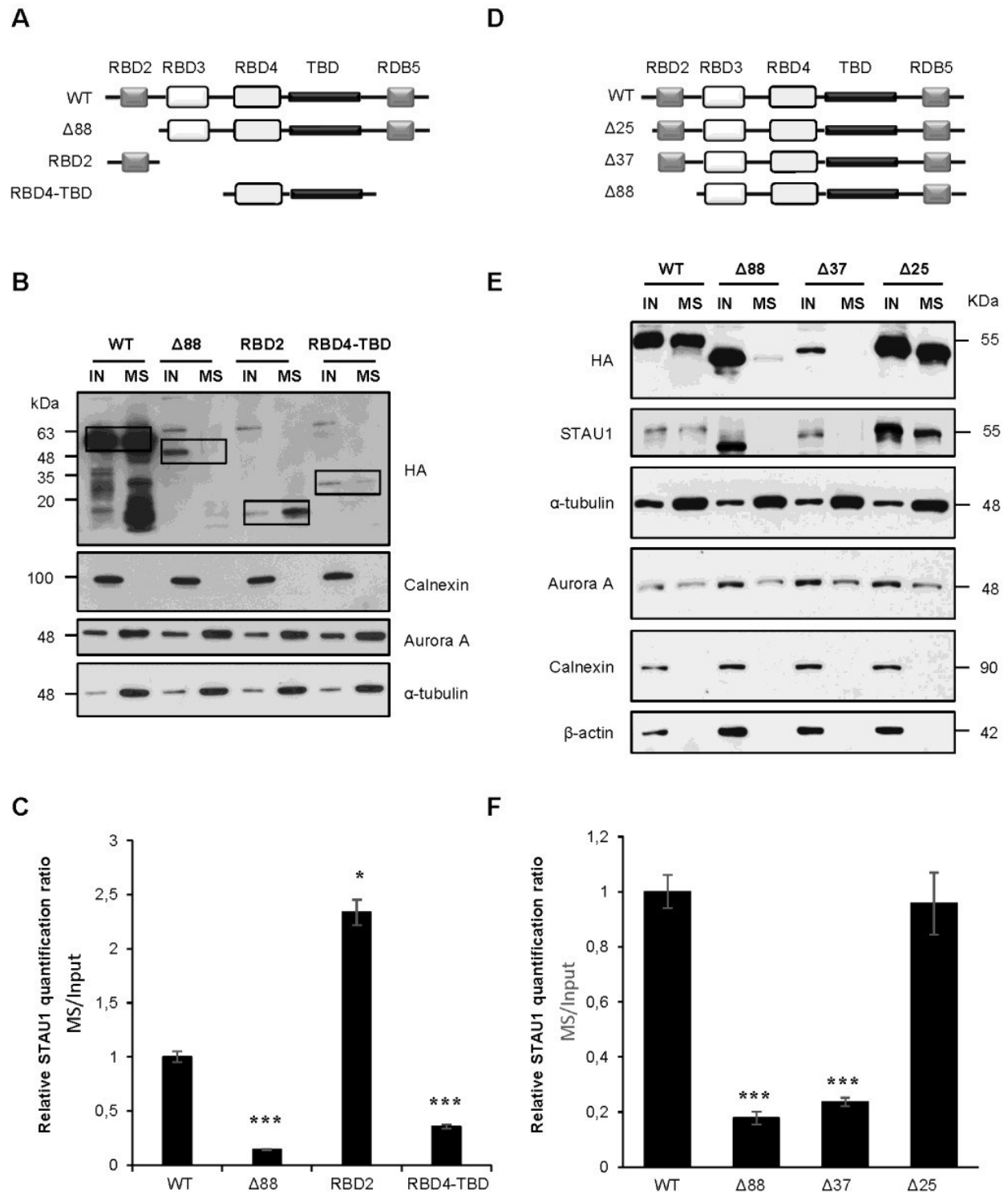


Figure 4 - Fine mapping of the N-terminal determinant responsible for STAU1-spindle association

(A, D) Schematic representations of STAU1 deletion mutants (see legend of figure 3A for box codes). (B, E) Proteins from total cell extracts (IN) and purified spindle preparations (MS) were analyzed by western blotting with specific antibodies. (C, F) Quantification of the amounts of STAU1 proteins on the mitotic spindle. The ratio of STAU1 amounts in the spindle preparations over that in the cell extracts was calculated. The graphs represent the means \pm s.d. of three independently performed experiments. The ratio obtained for STAU1 WT was arbitrary fixed to 1.

, p -value ≤ 0.05 ; **, p -value ≤ 0.001 .

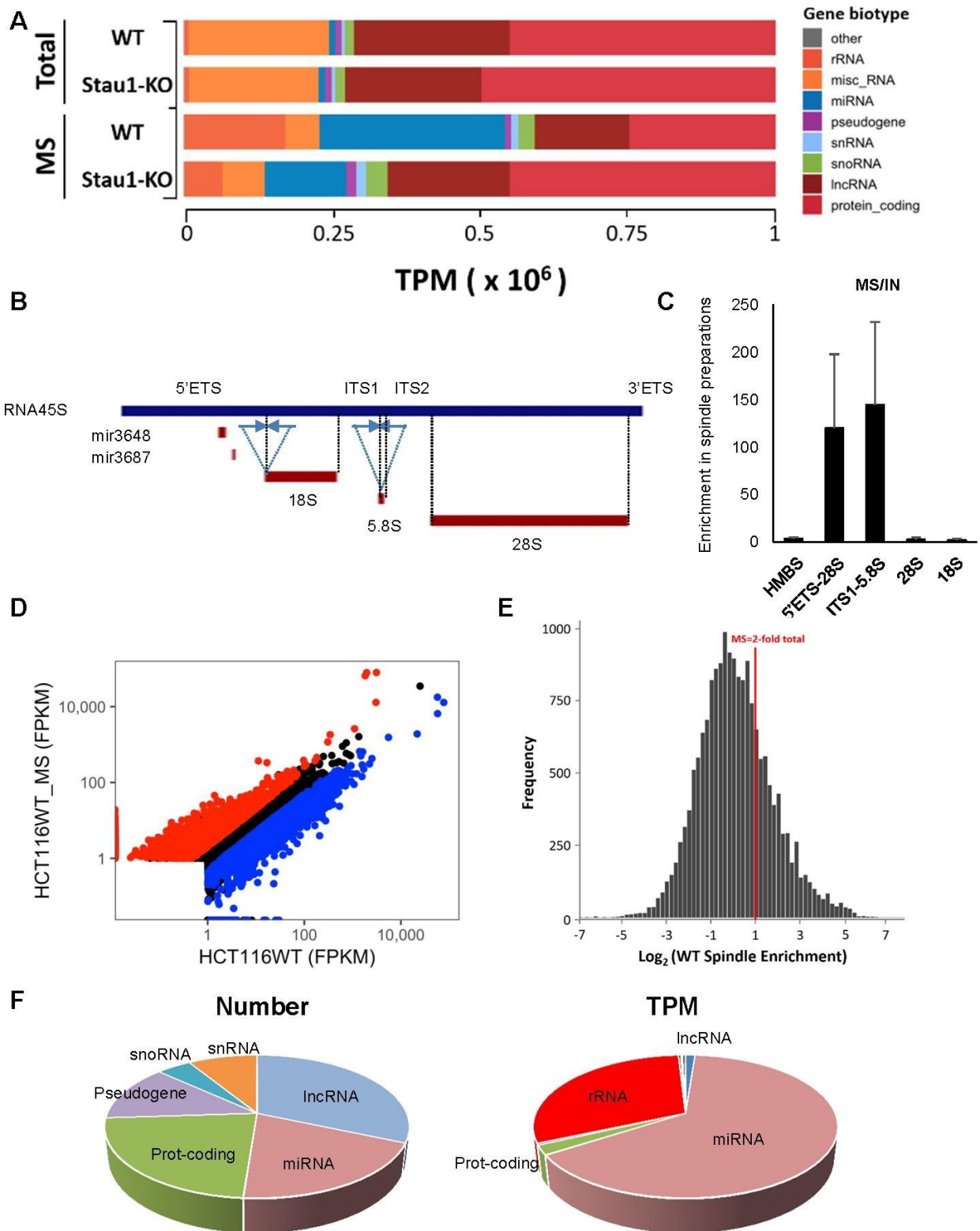


Figure 5 - Spindle-enriched transcriptome in HCT116 cells

(A) Histogram depicting the RNA biotype content, in transcripts per million (TPM), in total mitotic cell extracts (Total) and mitotic spindles (MS) from WT and STAU1-KO HCT116 cells. Biotypes accounting for less than 1% of the overall TPMs were grouped as “other”. (B) Schematic representation of the RNA28S5 locus showing the 45S pre-rRNA. Arrows indicate the position of the oligonucleotides used for RT-qPCR shown in (C). The position of miRNAs and mature rRNAs is shown. (C) RT-qPCR amplification of spindle-associated RNAs using oligonucleotides that recognized different parts of the 45S rRNA. The levels of enrichment in spindle preparations (MS) compared to cell extracts (IN) are shown. The graphs represent the mean and standard deviation of three independently performed experiments. HMBS, hydroxymethylbilane synthase; ETS, external transcribed spacer; ITS, internal transcribed spacer. (D) Scatter plots of the relative distribution of Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (FPKM) in mitotic spindles preparations (MS) vs. cell extracts in WT HCT116 cells. Red, RNAs at least 2-fold more abundant (p -value ≤ 0.05) in MS than in cell extracts. Blue, RNAs at least 2-fold less abundant (p -value ≤ 0.05) in MS than in cell extracts. (E) Histogram of the frequency of genes in function of their enrichment in MS preparations vs. cell extracts in WT cells. (F) Relative amount of RNAs that are delocalized from the spindle in the absence of STAU1-KO cells. The percentage of the number of different individual RNA in each biotype (left) and the percentage of TPM in each biotype (right) are shown.

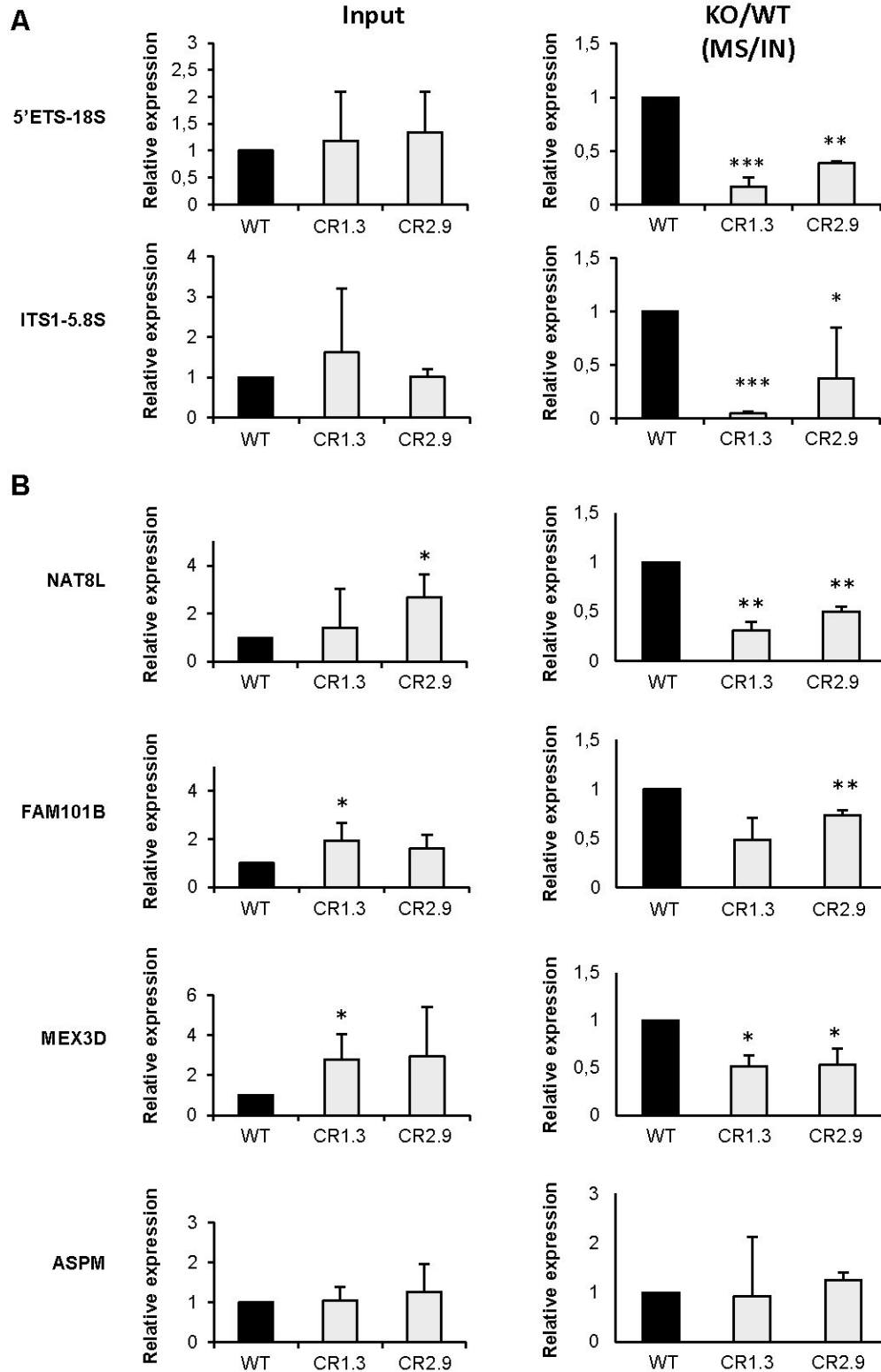


Figure 6 - Validation of RNA-Seq data by RT-qPCR

WT and STAU1-KO HCT116 cells were synchronized in mitosis. Two STAU1-CRISPR-KO cell lines (CR1.3 and CR2.9) generated with different RNA guides were used. RNAs in mitotic cell extracts (left) and in purified mitotic spindle preparations (right) were analyzed. RNAs were quantified by RT-qPCR with specific primer pairs. (A) The contribution of STAU1 in pre-rRNA localization is shown. The graphs represent the mean and standard deviation of three independently performed experiments. *, p -value ≤ 0.05 ; **, p -value ≤ 0.01 ; ***, p -value ≤ 0.001 . (B) The amount of mRNAs in cell extracts and in spindle preparations was expressed as the ratio of the amount of a specific gene over that of the negative controls HPRT+RPL22. The ratios obtained with RNAs in the spindle preparations were normalized to the ratio in the cell extracts in both STAU1-KO and WT cells. The ratio in WT cells was arbitrary fixed to 1. Data represents the means and standard deviation of four independently performed experiments. *ASPM*, abnormal spindle microtubule assembly; *MEX3D*, mex-3 RNA-binding family member D; *FAM101B*, refilin B; *NAT8L*, N-acetyltransferase 8 like; *HPRT*, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; *RPL22*, ribosomal protein L22.

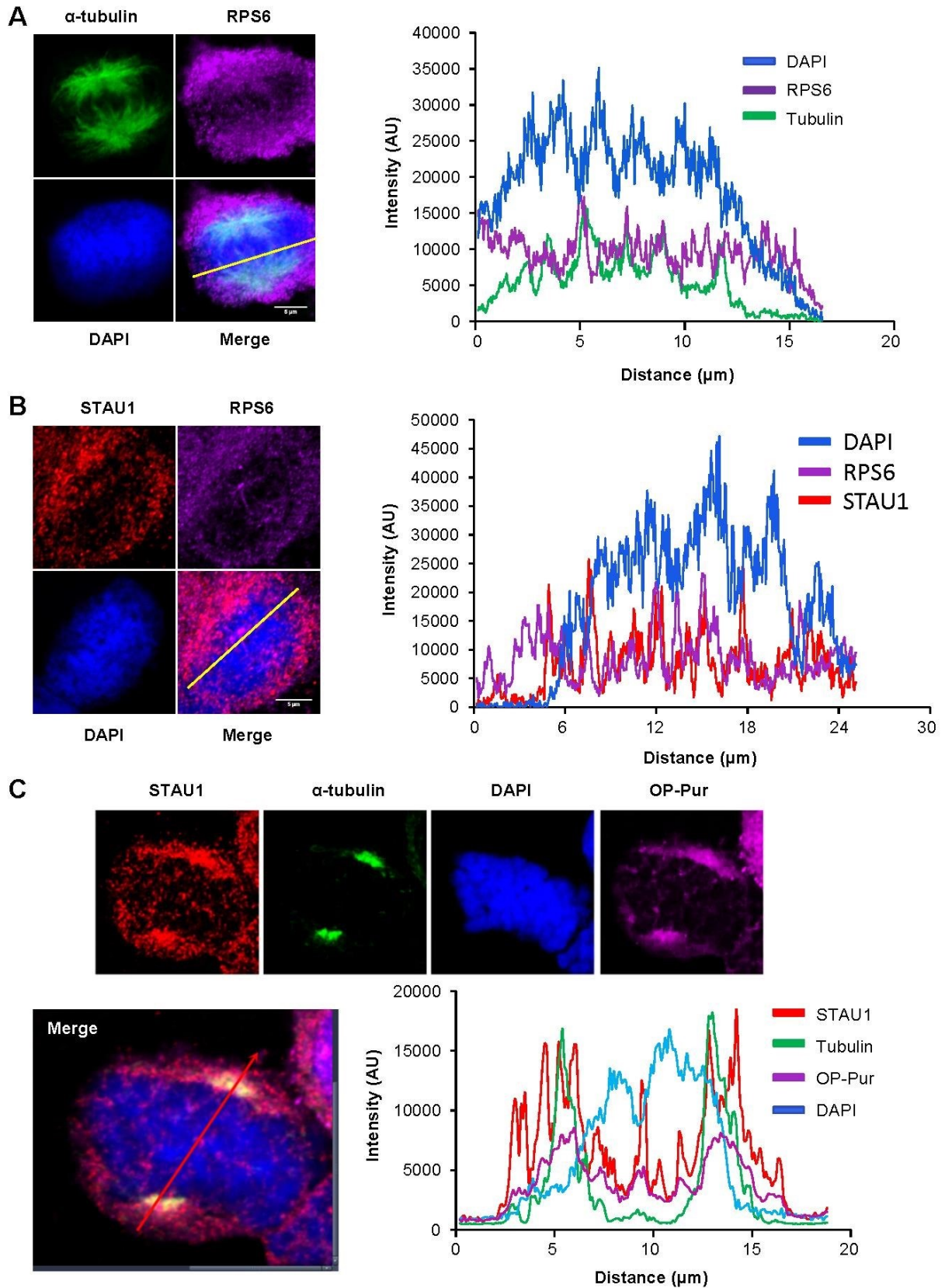


Figure 7 - Co-localization of STAU1 and the translation machinery on spindles

HCT116 cells were synchronized in late G₂ with the Cdk1 inhibitor RO-3306 and released from the block with fresh medium to reach mitosis. Cells were treated with Triton-X 100 to remove soluble materials before fixation. (A) Cells were stained with anti-S6 (RPS6) and anti-tubulin antibodies to localize ribosomes and the mitotic spindle, respectively. DNA was stained with DAPI. Line scan (right panel) analysis indicates co-localization of RPS6 and tubulin on fiber tracks. The figure is representative of three independently performed experiments giving similar results in every cell. (B) Cells were stained with anti-S6 (RPS6) and anti-STAU1 antibodies to localize ribosomes and STAU1, respectively. DNA was stained with DAPI. Line scan (right panel) analysis shows overlapping peaks of RPS6 and STAU1 signals. Scale bars = 5 μm. The figure is representative of three independently performed experiments giving similar results in every cell. (C) Cells were stained with anti-tubulin and anti-STAU1 antibodies as well as with O-propargyl-puromycin (OP-Pur), a marker of active translation. DNA was stained with DAPI. Co-localization was quantified by line scan analysis (bottom). The figure is representative of five independently performed experiments giving similar results in every cell.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1 - RNA-Seq of whole cell (Input) and spindle preparations (MS) isolated from WT (HCT) and STAU1-KO (CR1_3) cells

[Click here to Download Table S1](#)

Table S2 - List of genes that are misregulated in STAU1-KO compared to wild-type HCT116 cells (Input)

[Click here to Download Table S2](#)

Table S 3 - Spindle-enriched RNAs in WT and STAU1-KO HCT116 cells

[Click here to Download Table S3](#)

Table S 4 - Number of individual transcripts and of transcripts per million (TPM) across RNA biotypes of spindle-enriched RNAs. Enrichment of TPM in mitotic spindle compared to input is shown.

[Click here to Download Table S4](#)

Table S 5 - Gene ontology (GO) of spindle-enriched RNAs in HCT116 cells (Metascape Gene Annotation & Analysis Resource)

[Click here to Download Table S5](#)

Table S 6 - Downregulated RNAs in spindle preparations of STAU1-KO cells compared to WT cells.

[Click here to Download Table S6](#)

Table S 7 - Gene ontology (GO) of downregulated RNAs in spindle preparations of STAU1-KO cells compared to WT cells (Metascape Gene Annotation & Analysis Resource).

[Click here to Download Table S7](#)

SUPPLEMENTAL FIGURES

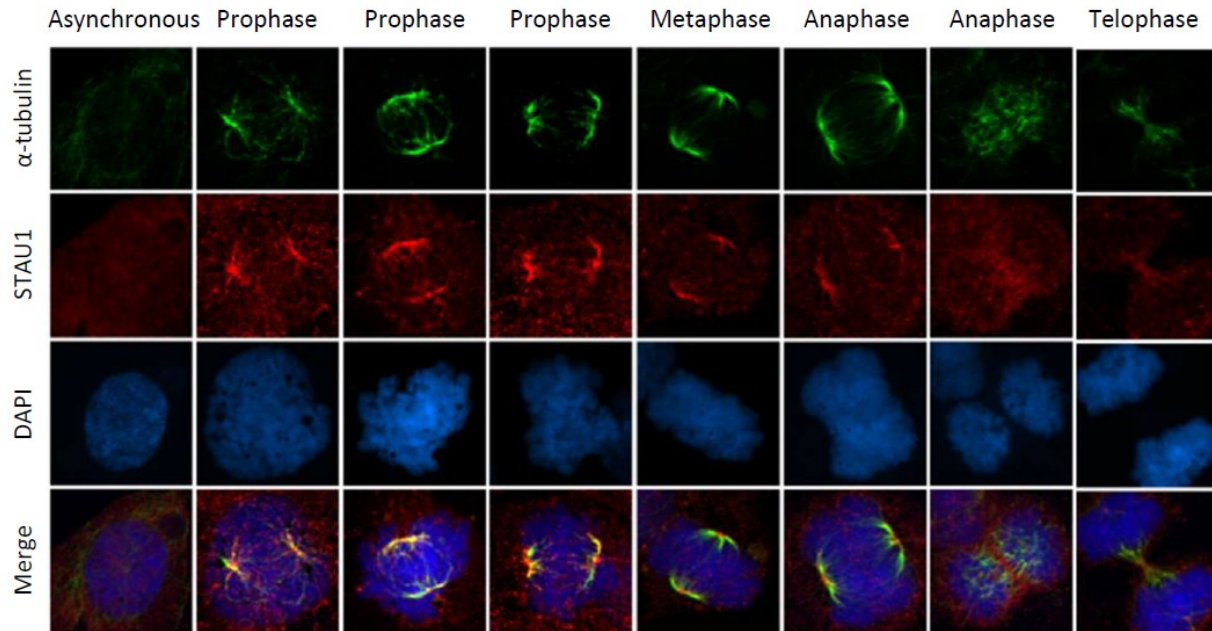


Figure S1 - Co-localization of STAUI and α -tubulin on mitotic spindle in the non-transformed hTERT-RPE1 cells

hTERT-RPE1 cells were synchronized in late G₂ with RO-3306 and released from the block with fresh medium to reach mitosis. Cells were treated with Triton X-100 and then fixed. Proteins were stained with specific antibodies to detect Stau1 and α -tubulin. DNA was stained with DAPI. Cells at different steps of mitosis are shown.

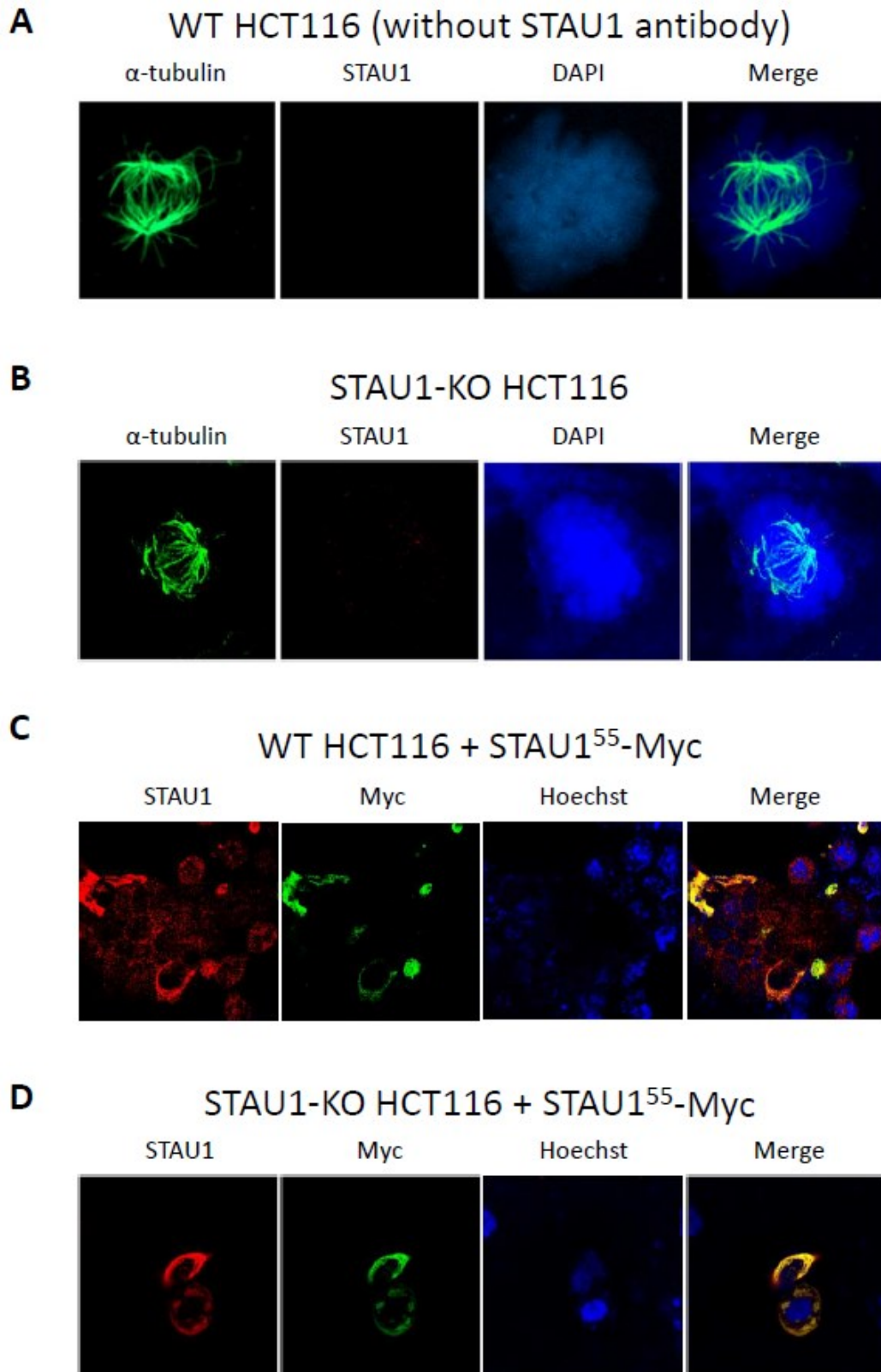


Figure S2 - Control of antibody specificity

(A) To control for antibody specificity, mitotic HCT116 cells were stained with rabbit anti-tubulin antibody and anti-mouse (usually used to detect STAU1 expression) and anti-rabbit secondary antibodies. In the absence of anti-STAU1 antibody, no signal was detected. (B) STAU1-KO HCT116 cells (clone CR1.3) were stained with anti-STAU1 and anti-tubulin antibodies. No signal was detected with anti-STAU1 antibody. (C, D) HCT116 (C) and HCT116-KO (clone CR1.3). (D) cells were transfected with a plasmid coding for STAU1⁵⁵-myc and stained with antiSTAU1 and anti-myc antibodies. Perfect colocalization of STAU1 and myc signals are observed. These experiments are representative of at least three independently performed experiments.

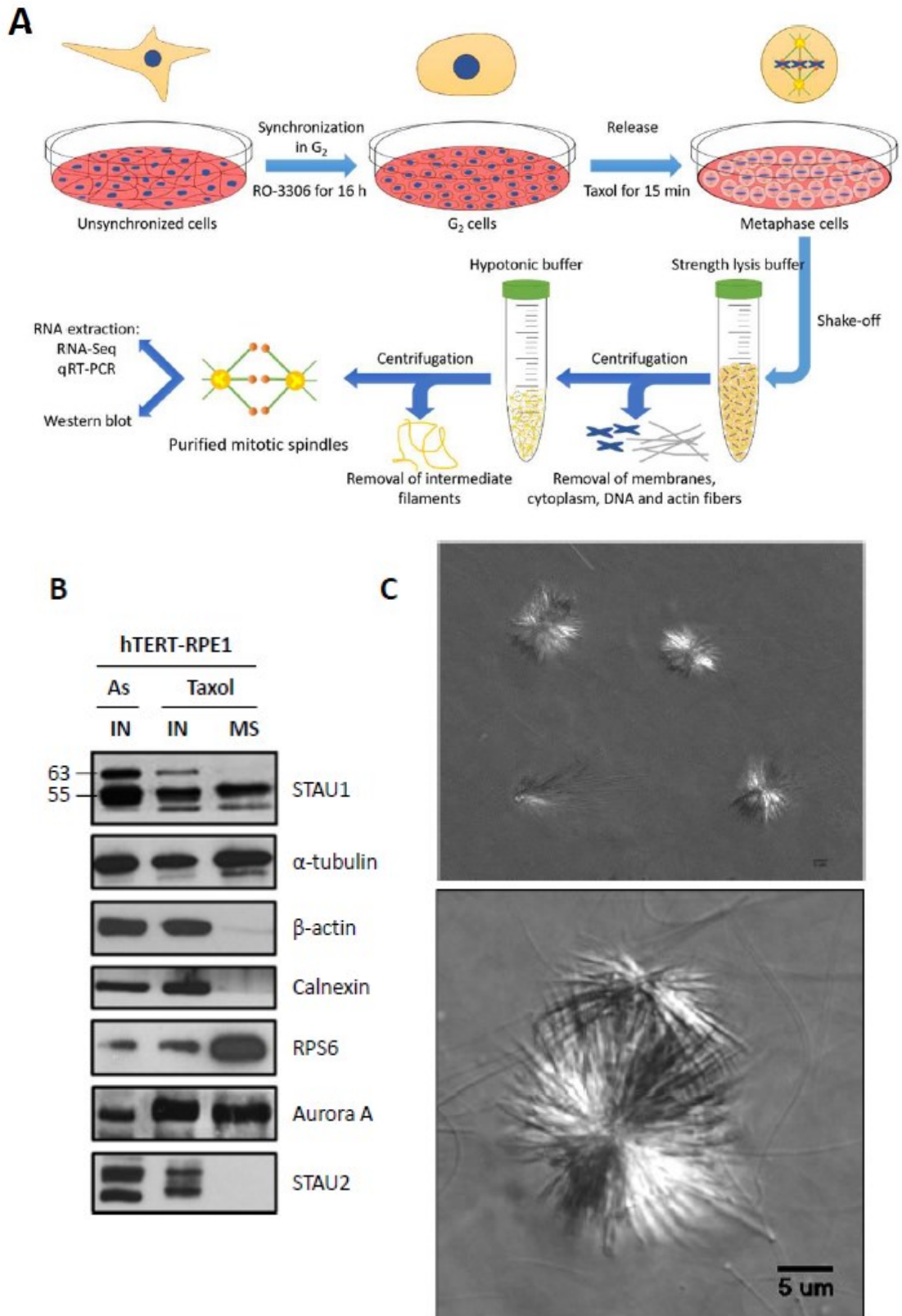
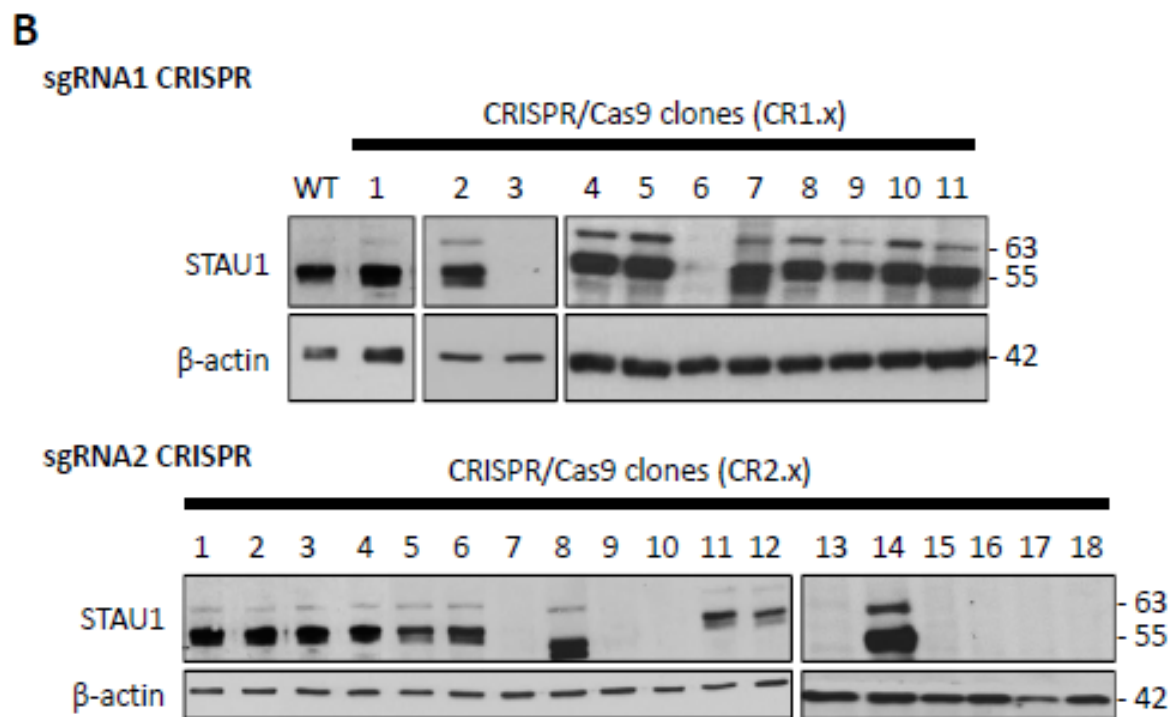
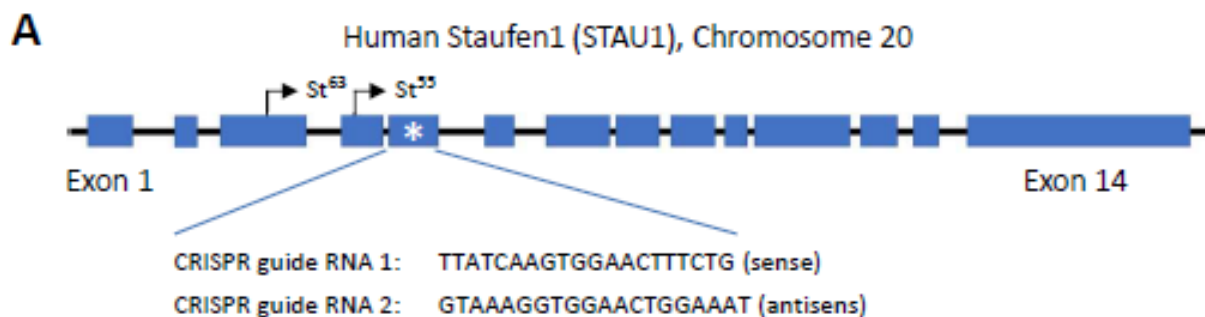
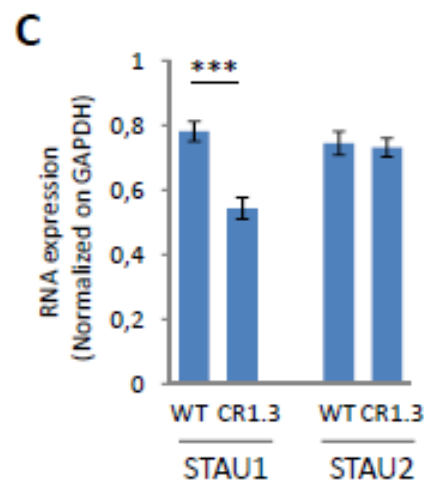
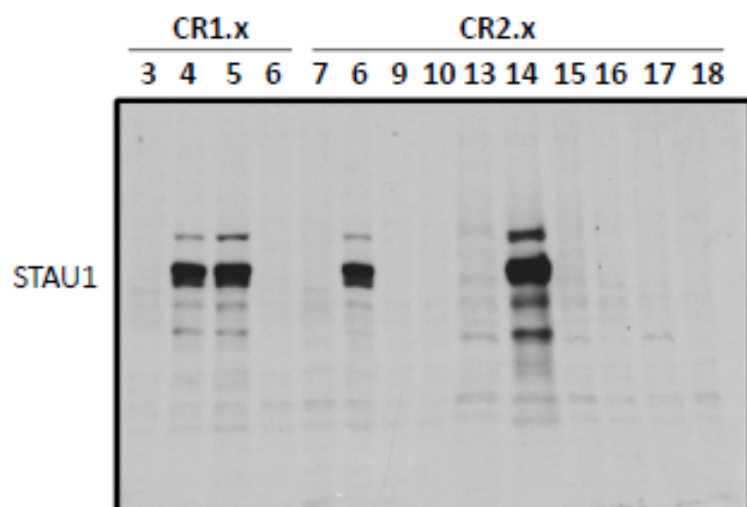


Figure S3 - Validation of spindle preparations by microscopy

(A) Schematic illustration of the protocol used to purify mitotic spindles. (B) hTERT-RPE1 cells were synchronized in prometaphase and treated with taxol to stabilize microtubules. Mitotic spindles were purified, and protein contents analyzed by western blotting. As, asynchronous cells; Taxol, mitotic cells; IN, input total cell extracts. MS: mitotic spindle. (n=3). (C) Aliquots of spindle preparations were spread on microscopic slides and visualized by microscopy.



Whole gel image



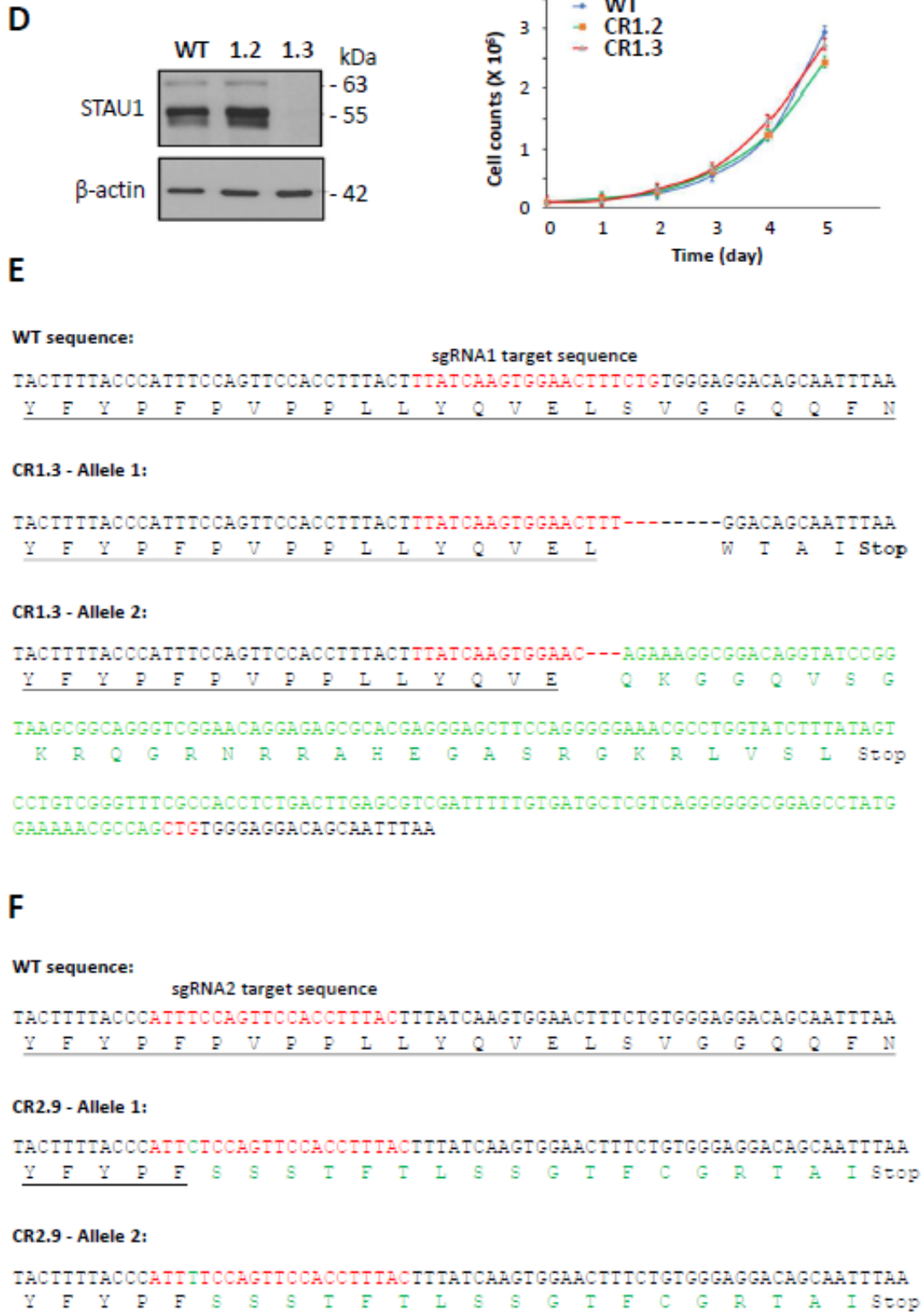


Figure S4 - Knockout of STAU1 in the colorectal HCT116 cancer cell line by the CRISPR/Cas9 complex system

(A) Schematic representation of the *STAU1* gene. Position of ATG initiation codons for *STAU1*⁵⁵ kDa and 63 kDa is indicated. *: site of CRISPR editing. Two different CRISPR guide RNAs were used. (B) HCT116 cells were transfected with plasmids expressing Cas9/sgRNA1 or Cas9/sgRNA2 complex targeting exon 5 of the *STAU1* gene. Colonies grown from single cell were screened for *STAU1* expression by western blotting. 18% and 44% of the clones that were transfected with CRISPR sgRNA1 and CRISPR sgRNA2, respectively, were negative for *STAU1* expression. Below, whole gel image of CR2.13 to CR2.18 cell extracts showing that *STAU1*-truncated products are not produced in CRISPR *STAU1*-KO cells. (C) Wild type (WT) and *STAU1*-KO (clone CR1.3) HCT116 cells were analyzed by RT-qPCR for *STAU1* and *STAU2* expression. (D) Cells were plated at the same density and counted every day for five days. The graph shows the means and standard deviation of cell counts of three independently performed experiments. (E,F) Biallelic sequencing of exon 5 of *STAU1* genomic DNA isolated from *STAU1*-KO CR1.3 (D) and CR2.9 (E) cells. Sequences of wild type (WT) and CRISPR alleles are shown as well as the corresponding protein sequence. The WT protein sequence is underlined. Red: Target sequences of the CRISPR sgRNA1. Green: Inserted nucleotides. Dash line: Deleted nucleotides.

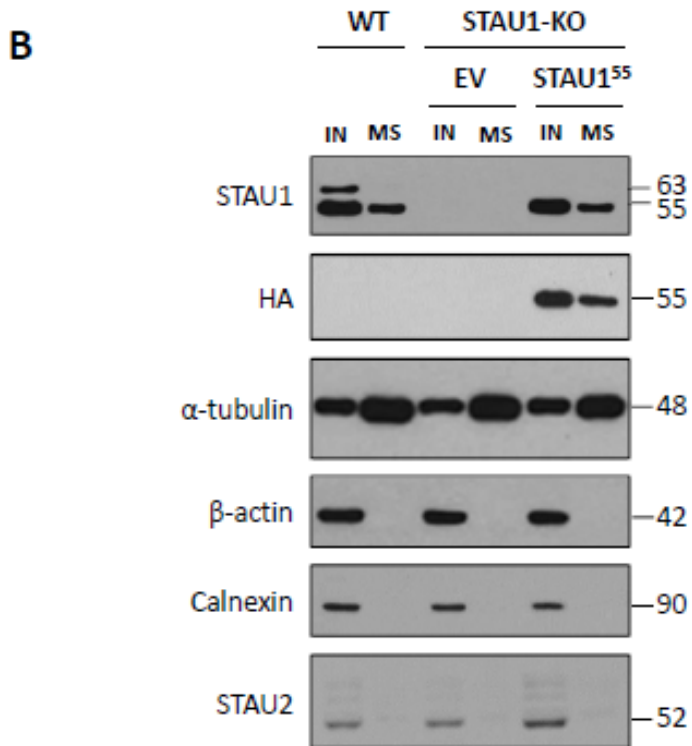
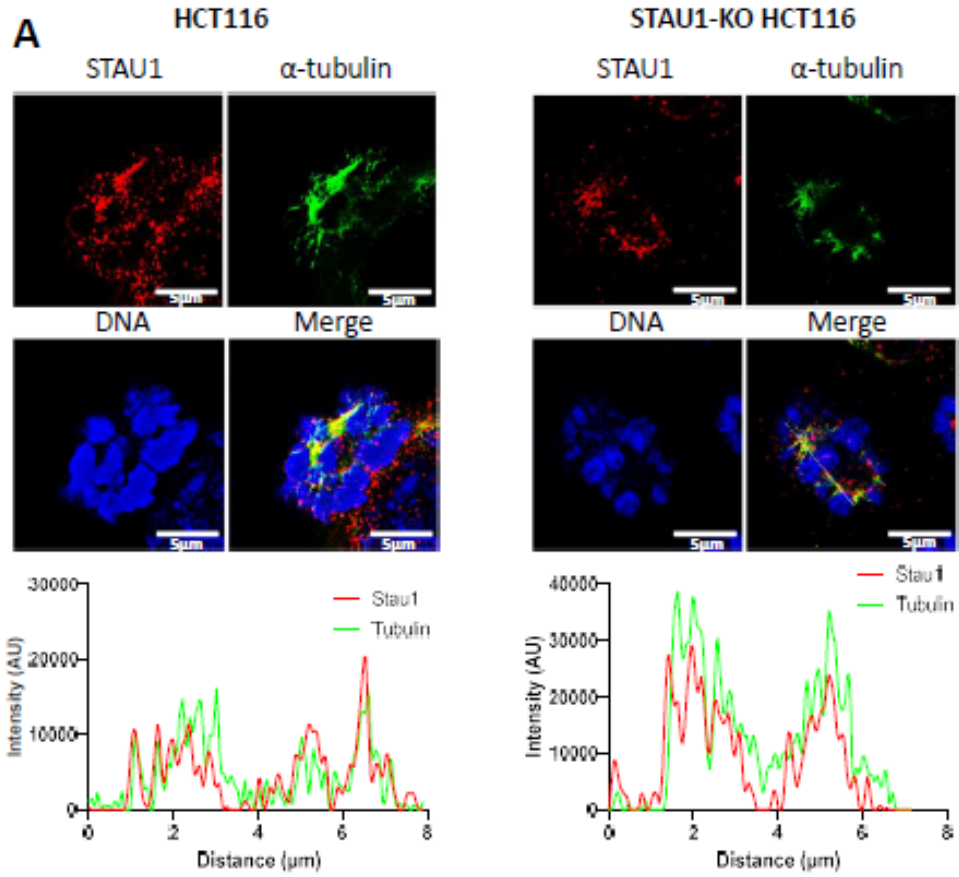


Figure S5 - Characterization of exogenously expressed STAU1⁵⁵

(A) HCT116 WT (left) and STAU1-KO CR1.3 (right) cells were transfected with a plasmid coding for STAU1⁵⁵-myc. STAU1 was detected with anti-STAU1 and anti-myc antibodies. Both signals co-localized as expected. (B) Exogenously transfected STAU1⁵⁵-HA₃ purifies in mitotic spindle preparations, as does the endogenous protein. Western blot experiment showing endogenous STAU1 in cell extracts (IN) and spindle preparations (MS) of HCT116 cells (WT) and STAU1-HA₃ in cell extracts (IN) and spindle preparations (MS) of STAU1-KO HCT116 cells.

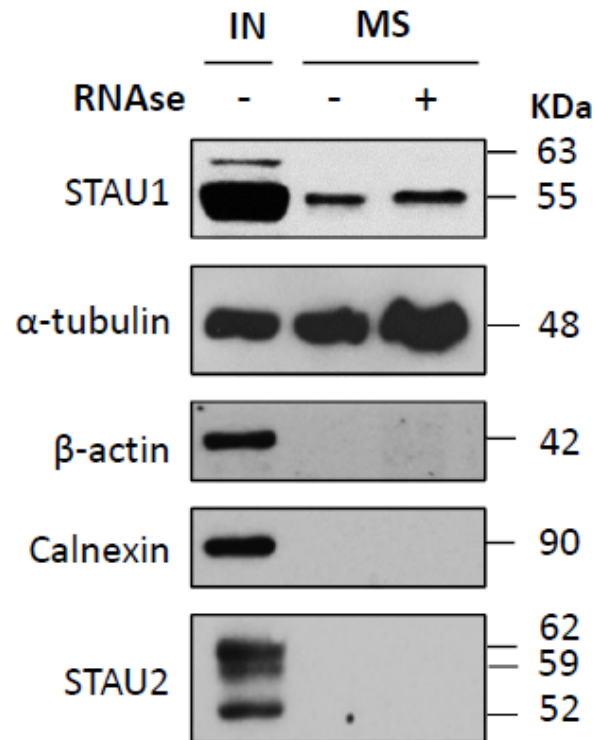


Figure S6 - STAU1 association with spindle is resistant to RNase treatment

Western blot experiment of cell extracts (IN) and mitotic spindle preparations (MS) purified in the presence (+) or absence (-) of RNase.

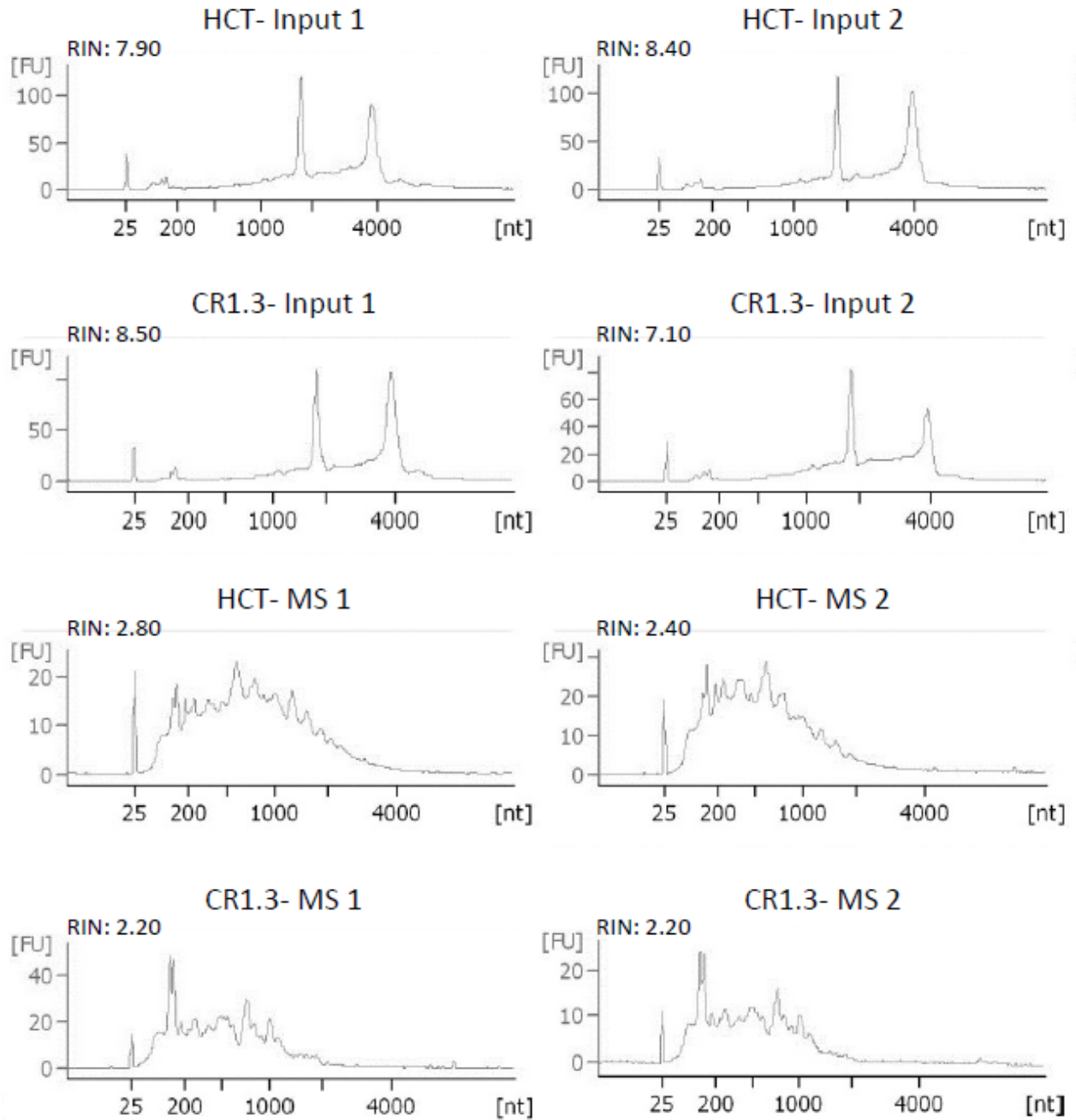


Figure S7 - Quality controls of RNA-Seq data

RNAs were isolated from WT (HCT) and STAU1-KO (CR1.3) HCT116 cells and analyzed by Agilent RNA Pico. RNAs from total cell extracts (Input) and mitotic spindle preparations (MS) are shown.

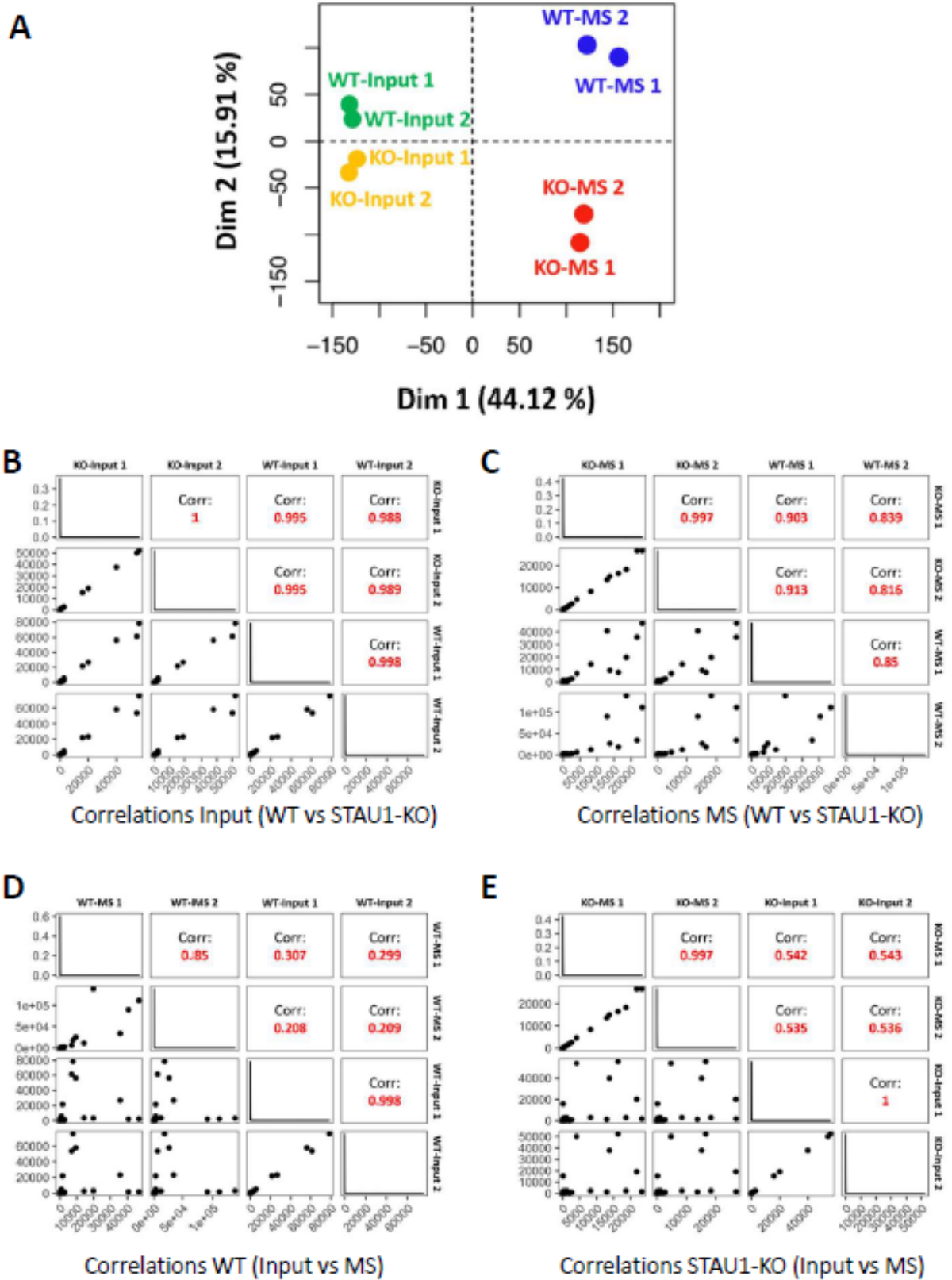


Figure S8 - Validation of the reproducibility of RNA-Seq data

(A) RNA-Seq data from replicates prepared from mitotic cell extracts (Input) and mitotic spindle preparations (MS) from WT and STAU1-KO (KO) cells were compared on PCA plot. (B-E) High degree of correlation was observed between duplicates of cell extracts (Input) and of spindle preparations (MS), respectively, and weak correlation between Input vs. MS preparations. Correlations between Input (A) and mitotic spindle replicates (B) in WT vs. STAU1-KO HCT116 cells. Correlations between WT (C) and STAU1-KO (D) input vs. MS.

3 Discussion générale

Les travaux présentés dans cette thèse s'intéressent à l'étude de STAUI, une protéine multifonctionnelle ayant la capacité de se lier à des ARNm double-brin pour contrôler leur expression spatio-temporelle et leur destin. Ainsi, STAUI est retrouvé dans les cellules humaines sous forme de trois isoformes, soit STAUI⁵⁵, STAUIⁱ et STAUI⁶³. STAUIⁱ diffère de STAUI⁵⁵ par l'insertion de 6 acides aminés, soit environ 0,6 kDa, dans le domaine RBD3. Il a été rapporté que STAUIⁱ pourrait être un régulateur des fonctions de STAUI⁵⁵, car la dimérisation des deux isoformes forme des dimères qui lient peu l'ARN.

Nos résultats ont permis de montrer que seul l'isoforme STAUI⁵⁵ cofractionne et colocalise avec les microtubules mitotiques des cellules HCT116. Cette observation est compatible avec les résultats obtenus par des analyses protéomiques menées à grande échelle sur des fractions du fuseau mitotique purifiées à partir des cellules d'origine humaine (HeLa) (350). Cette localisation différentielle des isoformes de STAUI pourrait être expliquée par la présence d'une extension de 81 acides aminés intégrée dans la région N-terminale de STAUI⁶³. Cette séquence est susceptible de modifier la configuration spatiale de STAUI⁶³ et par conséquent modifier l'accessibilité de certains sites d'interaction et son profil de localisation. Il serait donc intéressant d'étudier la distribution subcellulaire de l'isoforme 63 kDa en mitose ainsi que ses fonctions au cours du cycle cellulaire. Tout comme l'isoforme 63 kDa, le paralogue STAUI2, partenaire de STAUI dans le SMD, ne colocalise pas avec le fuseau.

Dans la continuité de notre démarche, nous avons voulu caractériser les déterminants impliqués dans la localisation de STAUI⁵⁵ sur le fuseau mitotique. Au début, nous avons émis les hypothèses suivantes : i) STAUI se sert de son domaine de liaison à la tubuline pour s'associer aux microtubules mitotiques. ii) les deux domaines de liaisons à l'ARN RBD3 et RBD4 confèrent à

STAU1 la faculté de s'associer à des mRNP destinés à être déposés sur le fuseau mitotique. iii) STAU1 se sert de son association avec les ribosomes via RBD4-TBD pour se localiser sur le fuseau avec des transcrits codants pour des protéines requises localement. iiiii) plusieurs éléments sont impliqués de façon concomitante. Afin d'étudier ces hypothèses, nous avons procédé à la purification du fuseau dans des conditions différentes : sans ou avec RNase, et en surexprimant des mutants de délétion de différents domaines de STAU1 : Δ -TBD, Δ -RBD2/3/4/5, Δ -RBD3-RBD4, Δ -RBD4-TBD, ainsi que d'autres combinaisons. Les résultats obtenus montrent clairement que le domaine de liaison à la tubuline, l'activité de liaison à l'ARN et l'association aux ribosomes ne sont pas essentiels dans l'interaction de STAU1 avec les microtubules mitotiques. En effet, tous les mutants conservent leur capacité de s'associer au fuseau à l'exception du Δ -RBD2. De plus, on a trouvé que le domaine RBD2-HA₃ est capable de s'associer au fuseau mitotique quand il est exprimé dans les cellules STAU1-KO. Ces résultats "inattendus" nous ont poussés à creuser un peu plus pour affiner la cartographie du déterminant minimal requis pour l'interaction de STAU1 avec le fuseau mitotique. Plusieurs mutants de délétion ont été employés. Ces essais ont permis de localiser le déterminant moléculaire entre les acides aminés 26 et 37 (²⁶MRGGAYPPRYFY³⁷). Cependant, le mécanisme par lequel la région N-terminale de STAU1 interagit avec les microtubules mitotiques demeure encore inconnu. Ceci inclut le rôle d'autres modifications post-traductionnelles qui peuvent influencer la capacité de STAU1 à établir des interactions protéine-protéine ou protéine-ARN, ou bien affecter sa localisation. Il serait par conséquent approprié d'investiguer l'implication des prolines P32 et P33, la méthylation des arginines R27 et R34 ainsi que la phosphorylation des tyrosines Y35 et Y37 dans ce processus (411).

Par ailleurs, les 88 premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale, où se trouve RBD2, contient les motifs de reconnaissance et de recrutement du complexe APC/C qui est responsable de la dégradation subséquente de STAU1 à la sortie de mitose (315). Le recrutement de l'ubiquitine

ligase dans la région N-terminale peut se faire également via deux motifs (³²PPRY³⁵ et ³⁷YPFVPPPL⁴³) potentiellement cibles du complexe ESCRT « *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* », une machinerie de transport endosomal qui a été conservée tout au long de l'évolution et joue un rôle essentiel dans des fonctions biologiques : la signalisation cellulaire, la morphogénèse neuronale, la biogénèse et la fonction de vésicules extracellulaires. Ce complexe se localise à son tour sur l'appareil mitotique et module plusieurs événements de la mitose. En effet, la machinerie ESCRT intervient dans le positionnement et la duplication du centrosome, l'organisation et la stabilité du fuseau, l'attachement des kinétochores, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC), la reconstitution de l'enveloppe nucléaire et la cytokinèse (412-416).

Ainsi, certaines observations de ce qui précède sont consistantes avec nos résultats préliminaires. En effet, STAU1 colocalise avec une protéine du centrosome, soit la péricentrine (Pcnt). STAU1 montre une forte association avec le centrosome avant même la transition G2/M, soit à la fin de l'interphase (Figure 1) et tout au long de la mitose. Ces données préliminaires tendent à suggérer un rôle potentiel de la protéine STAU1 dans le centre d'organisation des microtubules ce qui pourrait expliquer l'effet antiprolifératif de la déplétion de STAU1 dans les cellules non transformées. Il serait intéressant d'étudier le mécanisme par lequel STAU1 s'associe aux centrosomes et d'identifier si des transcrits sont localisés par STAU1 sur cette structure. Il serait également pertinent de voir si l'inhibition de l'interaction entre STAU1 et les composants du centrosome pourrait influencer la prolifération cellulaire.

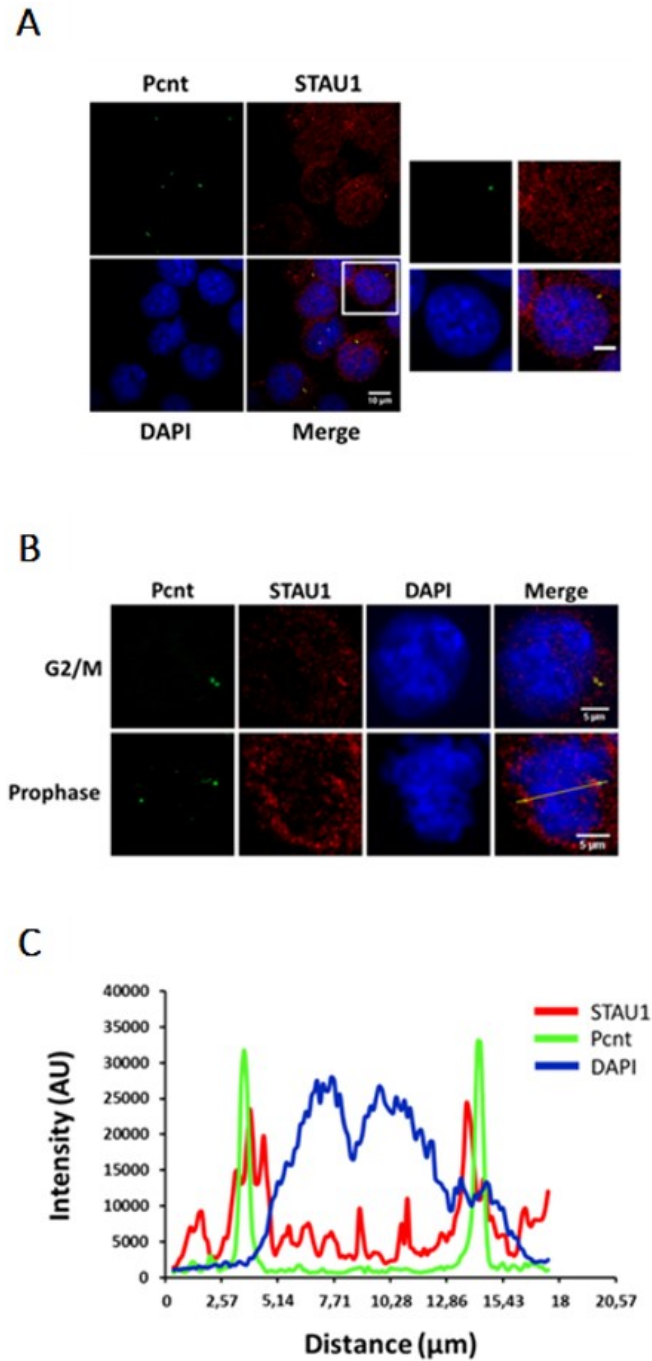


Figure 1 - Localisation de STAU1 aux centrosomes

Images confocales des cellules HCT116 montrant la colocalisation de STAU1 et Pcnt en interphase (A), durant la transition G2/M et en prophase (B). La colocalisation de STAU1 avec Pcnt a été identifiée par Linescan (C).

L'association de STAUI avec les composants de l'appareil mitotique suscite de nombreux questionnements. Au-delà de l'étude de son mode d'action sur les transcrits localisés au niveau du fuseau mitotique, l'étude approfondie des partenaires protéiques de STAUI sur cette structure fournirait de l'information essentielle à l'avancée de la recherche sur les voies de signalisation qu'emprunte STAUI dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique en mitose. La découverte de ces voies pourrait révéler des données capitales sur le remodelage des RNP et la dynamique des régulateurs qui influencent la vitesse de prolifération selon le niveau d'expression de STAUI, le type cellulaire et le contexte tissulaire.

Après avoir montré la localisation de STAUI sur le fuseau mitotique, nous avons cherché à identifier les transcrits qui lui sont associés sur cet organite cellulaire. À ce niveau, il nous a paru essentiel de créer des lignées cellulaires, non transformées et cancéreuses, n'expriment pas STAUI. Pour ce fait, on a utilisé la technique de CRISPR/Cas9 chez les cellules hTERT-RPE1 et HCT116 pour cibler le gène STAUI à son exon 5 par le biais de deux guides d'ARN, soit sgRNA1 et sgRNA2. Contrairement aux cellules hTERT-RPE1 non transformées, nous avons réussi à avoir plusieurs clones CRISPR positifs dans les cellules cancéreuses HCT116. Bien que STAUI contrôle des transcrits codant pour des protéines impliquées entre autres dans le métabolisme cellulaire et la prolifération, l'annulation de son expression n'affecte pas la prolifération cellulaire de notre clone positif sur un support solide. À l'opposé de la surexpression, la délétion de STAUI dans les cellules du cancer colorectal est sans effet visible sur la prolifération et l'invasion tumorale *in vitro*.

Contrairement aux cellules transformées HCT116, nos tentatives d'inactiver STAUI dans les cellules immortalisées hTERT-RPE1 ont toutes échoué, et les clones supposés être CRISPR positif finissent par s'éteindre. Nos observations préliminaires concordent avec les résultats rapportés récemment par notre équipe et qui indiquent que la baisse drastique du niveau d'expression de STAUI perturbe la progression de la mitose et inhibe la prolifération des cellules

non transformées en induisant un retard de l'entrée en phase S, et un délai au niveau de la transition G2/M (316). Il est donc légitime d'envisager que la mort cellulaire induite par l'inactivation de STAU1 chez les cellules non transformées est un système de défense dérégulé chez les cellules cancéreuses. D'ailleurs, il a été montré que l'altération de l'expression et/ou des fonctions de STAU1 est associée à l'apparition de nombreuses pathologies, telles que les maladies neurodégénératives, neuromusculaires et le développement tumoral. Cependant, des données rapportées par notre laboratoire suggèrent que la surexpression de STAU1 ralentit la sortie de la mitose et inhibe la prolifération chez les cellules de cancer colorectal. Il est possible que la voie de régulation habituelle soit contournée dans les cellules cancéreuses pour s'échapper des points de contrôle du cycle cellulaire et que cette dérégulation soit rattrapée par l'expression ectopique de STAU1 ce qui entraîne l'arrêt de la prolifération tumorale. La compréhension mécanistique du rôle de STAU1 dans cette voie de signalisation nécessite la caractérisation moléculaire de tous les facteurs impliqués, ainsi l'identification de toutes les modifications post-traductionnelles qui contrôlent leurs activités.

Bien que le transcriptome de l'extrait total dans les cellules STAU1-KO soit similaire à celui dans les cellules de type sauvage, nos analyses indiquent que STAU1⁵⁵ est impliqué dans la dynamique de l'expression génique sur le fuseau mitotique. Avec des paramètres qui nous permettent d'être plus stricts, on a identifié plusieurs types d'ARN dont la localisation sur le fuseau dépend de STAU1. L'analyse des données bio-informatiques montrent que les pré-ARNr constituent à la fois le type d'ARN le plus abondant sur le fuseau, mais aussi le plus délocalisé après la délétion de STAU1. Ce type d'ARN est directement impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaire et la reconstitution de l'enveloppe nucléaire des cellules filles néoformées. Ainsi, STAU1 contribue dans la répartition des ARNr maternels entre les cellules filles, et ce, par la localisation de ces transcrits sur le fuseau mitotique de la cellule mère surtout que STAU1 opte

pour une distribution cytoplasmique après l'anaphase. Ces observations indiquent pour la première fois que les précurseurs ribosomiaux sous leurs formes complètes sont des composants importants du transcriptome du fuseau. De plus, elles suggèrent une nouvelle fonction putative de STAU1 dans le trafic des pré-ARNr durant la mitose et la transmission des composants de la machinerie nucléaire aux cellules filles.

Une population des ARNm codants pour des protéines montre aussi une délocalisation du fuseau mitotique à la suite de la délétion de STAU1. Plusieurs candidats de cette population sont connus pour être des cibles de STAU1. Cependant, le pourcentage de cette délocalisation est considéré faible comparativement à celui des pré-ARNr. Ce faible taux peut s'expliquer par l'incorporation des lectures additionnelles pour compenser la disparition des ARN ribosomiaux du fuseau mitotique STAU1-KO par rapport au fuseau mitotique STAU1-WT. Contrairement aux pré-ARNr, le destin des ARNm localisés sur le fuseau mitotique n'est pas trop clair. Notre tentative de comprendre ce processus a abouti à l'identification du phénomène de régulation de la traduction d'un groupe d'ARNm sur le fuseau mitotique. Ces données sont supportées par des résultats préliminaires obtenus par profilage des polyribosomes dans une tentative de recenser l'association de STAU1 avec les polyribosomes en mitose (Figure 2).

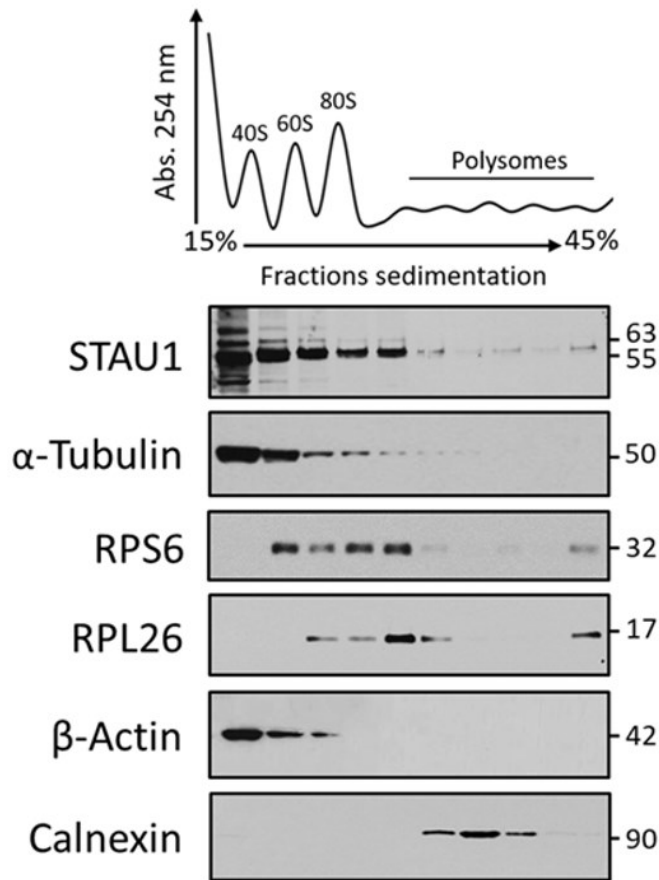


Figure 2 - Présence de STAU1 dans les fractions de polyribosomes

Expérience préliminaire de profilage des polyribosomes à partir des extraits provenant des cellules HCT116 synchronisées en mitose puis traitées avec 100 μ g/ml de cycloheximide. Les cellules sont vidées de leur contenu soluble et lysées. Le lysat cellulaire est sédimenté sur un gradient de sucrose (15-45%) puis profilé selon une absorption à 254 nm. Les fractions sont analysées par immunobuvardages de type western.

Ces résultats préliminaires montrent que STAU1⁵⁵ co-fractionne avec les ribosomes et les polysomes. Cela appuie l'idée que STAU1 jouerait un rôle sur le contrôle de la traduction durant la mitose et soulève plusieurs hypothèses quant à son mécanisme d'action. STAU1 pourrait séquestrer des ARNm réprimés en phase d'élongation sur le fuseau mitotique pour une répartition

subséquente entre les cellules filles. Il est aussi envisageable que STAU1 induise la traduction locale de certaines cibles pour promouvoir un effet direct sur la dynamique du fuseau et/ou indirect sur la progression de la mitose.

4 Perspectives :

Plusieurs études antérieures menées à grande échelle avaient identifié des populations d'ARN associées à STAU1. Cependant, ces études ont été réalisées sur des lignées cellulaires transformées (HeLa, HEK293). De plus, les essais d'immunoprécipitation ont été réalisées sur des cellules asynchrones et ciblent les protéines STAU1 exprimées de manière exogène. Afin d'identifier la dynamique des transcrits associés à STAU1 au cours de la division cellulaire, il serait pertinent d'enrichir des cellules (transformées et non transformées) à différentes phases de la mitose et d'immunoprécipiter l'ARN associé à la protéine STAU1 endogène. L'utilisation de l'approche hiCLIP permettra non seulement d'identifier les cibles spécifiques de STAU1 dépendamment des phases mitotiques, mais elle mettra en évidence les sites de liaison de STAU1 avec ses ARN cibles.

Ainsi, il serait intéressant de visualiser la dynamique de liaison de STAU1 avec ses cibles et de faire des études plus poussées sur la traduction locale de certains ARNm parmi la liste identifiée, que ce soit par hybridation *in situ* (FISH) ou par visualisation à temps réel dans des cellules vivantes à l'aide de SINAPS « *Single molecule Imaging of NAscent PeptideS* ». L'étude dans différentes conditions (niveau d'expression, type cellulaire, etc.) de la dynamique de traduction en temps réel des transcrits localisés par STAU1 sur le fuseau mitotique permet d'identifier les moments propices de l'activation et l'atténuation de leurs activités de synthèse protéique, ainsi informerait davantage sur les voies de signalisation dépendantes de STAU1 et pourrait potentiellement révéler une voie contournée dans la prolifération tumorale. Enfin, une purification des complexes protéiques de STAU1 sur le fuseau, couplée à l'analyse par spectrométrie de masse permettrait d'identifier les partenaires protéiques de cette protéine sur l'appareil mitotique.

5 Conclusion

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans cette thèse montrent l'implication de la protéine de liaison à l'ARN double-brin STAU1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique en mitose. En effet, STAU1⁵⁵ contrôle la colocalisation des transcrits spécifiques au niveau de l'appareil mitotique dans les cellules de cancer colorectal humain HCT116. Ainsi, nous avons montré pour la première fois que STAU1⁵⁵ contrôle la localisation de la forme complète des précurseurs ribosomiaux, ainsi que les composants de la machinerie nucléaire, sur le fuseau mitotique afin d'être répartis entre la progéniture. Malgré son implication majeure dans la modulation de divers processus cellulaires, nos résultats suggèrent que STAU1 n'est pas essentiel pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses HCT116. En effet, sa délétion n'affecte pas le pouvoir prolifératif et tumoral chez ces cellules. Nos observations concordent avec les autres travaux portant sur le rôle de STAU1 dans la régulation de la prolifération cellulaire et le développement tumoral.

Références bibliographiques

1. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* (New York, NY). 2011;331(6024):1553-8.
2. Crick FH. DNA: test of structure? *Science* (New York, NY). 1970;167(3926):1694.
3. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307-15.
4. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):359-70.
5. Campisi J. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* (New York, NY). 2005;309(5736):886-7.
6. Schulz KN, Bondra ER, Moshe A, Villalta JE, Lieb JD, Kaplan T, et al. Zelda is differentially required for chromatin accessibility, transcription factor binding, and gene expression in the early *Drosophila* embryo. *Genome Res*. 2015;25(11):1715-26.
7. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*. 2002;108(4):501-12.
8. Parent A, Bisailon M. [Synergy between transcription and mRNA processing events]. *Medecine sciences : M/S*. 2006;22(6-7):626-32.
9. Carmody SR, Wentz SR. mRNA nuclear export at a glance. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 12):1933-7.
10. Galloway A, Cowling VH. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2019;1862(3):270-9.
11. Millevoi S, Vagner S. Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic acids research*. 2010;38(9):2757-74.
12. Staley JP, Guthrie C. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*. 1998;92(3):315-26.
13. Sibley CR. Regulation of gene expression through production of unstable mRNA isoforms. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(4):1196-205.
14. Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, Dujardin G, Petrillo E, Munoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(3):153-65.
15. Le Hir H, Sauliere J, Wang Z. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(1):41-54.
16. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):108-21.
17. Moehle EA, Braberg H, Krogan NJ, Guthrie C. Adventures in time and space: splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate. *RNA biology*. 2014;11(4):313-9.

18. Soemedi R, Cygan KJ, Rhine CL, Glidden DT, Taggart AJ, Lin CL, et al. The effects of structure on pre-mRNA processing and stability. *Methods (San Diego, Calif)*. 2017;125:36-44.
19. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*. 2003;4(7):223.
20. Schmidt MJ, Norbury CJ. Polyadenylation and beyond: emerging roles for noncanonical poly(A) polymerases. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2010;1(1):142-51.
21. Coller J, Parker R. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:861-90.
22. Delaleau M, Borden KL. Multiple Export Mechanisms for mRNAs. *Cells*. 2015;4(3):452-73.
23. Okamura M, Inose H, Masuda S. RNA Export through the NPC in Eukaryotes. *Genes (Basel)*. 2015;6(1):124-49.
24. Wickramasinghe VO, Laskey RA. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16:431.
25. Terry LJ, Wentz SR. Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryotic cell*. 2009;8(12):1814-27.
26. Kabachinski G, Schwartz TU. The nuclear pore complex--structure and function at a glance. *Journal of cell science*. 2015;128(3):423-9.
27. Keminer O, Siebrasse JP, Zerf K, Peters R. Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(21):11842-7.
28. Folkmann AW, Collier SE, Zhan X, Aditi, Ohi MD, Wentz SR. Gle1 functions during mRNA export in an oligomeric complex that is altered in human disease. *Cell*. 2013;155(3):582-93.
29. Reed R, Hurt E. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*. 2002;108(4):523-31.
30. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry Biokhimiia*. 2007;72(13):1439-57.
31. Hutten S, Kehlenbach RH. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in cell biology*. 2007;17(4):193-201.
32. Jani D, Lutz S, Hurt E, Laskey RA, Stewart M, Wickramasinghe VO. Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic acids research*. 2012;40(10):4562-73.
33. Wickramasinghe VO, McMurtrie PI, Mills AD, Takei Y, Penrhyn-Lowe S, Amagase Y, et al. mRNA export from mammalian cell nuclei is dependent on GANP. *Current biology : CB*. 2010;20(1):25-31.
34. Bergalet J, Lecuyer E. The functions and regulatory principles of mRNA intracellular trafficking. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;825:57-96.
35. Jeffery WR, Tomlinson CR, Brodeur RD. Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Developmental biology*. 1983;99(2):408-17.

36. Vazquez-Pianzola P, Suter B. Conservation of the RNA Transport Machineries and Their Coupling to Translation Control across Eukaryotes. *Comp Funct Genomics*. 2012;2012:287852.
37. Ryder PV, Lerit DA. RNA localization regulates diverse and dynamic cellular processes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2018;19(7):496-502.
38. Lécuyer E, Yoshida H, Parthasarathy N, Alm C, Babak T, Cerovina T, et al. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell*. 2007;131(1):174-87.
39. Blower MD, Feric E, Weis K, Heald R. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *The Journal of cell biology*. 2007;179(7):1365-73.
40. Lipshitz HD, Smibert CA. Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(5):476-88.
41. Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, Skamagki M, Grabarek JB, Johnson MH, et al. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes & development*. 2008;22(19):2692-706.
42. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2002;3(5):321-30.
43. Mingle LA, Okuhama NN, Shi J, Singer RH, Condeelis J, Liu G. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 11):2425-33.
44. Du TG, Schmid M, Jansen RP. Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(2):171-7.
45. St Johnston D. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell*. 1995;81(2):161-70.
46. Kloc M, Wilk K, Vargas D, Shirato Y, Bilinski S, Etkin LD. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development (Cambridge, England)*. 2005;132(15):3445-57.
47. Jenny A, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt Sinai J Med*. 2006;73(5):738-50.
48. Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, et al. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell*. 2005;123(2):249-63.
49. Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:335-94.
50. St Johnston D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):363-75.
51. Takizawa PA, Sil A, Swedlow JR, Herskowitz I, Vale RD. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature*. 1997;389(6646):90-3.
52. Sil A, Herskowitz I. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell*. 1996;84(5):711-22.

53. Chartrand P, Singer RH, Long RM. RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:297-310.
54. Jan YN, Jan LY. Asymmetric cell division. *Nature.* 1998;392(6678):775-8.
55. Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2001;2(1):11-20.
56. Atwood SX, Prehoda KE. aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Current biology : CB.* 2009;19(9):723-9.
57. Cody NA, Iampietro C, Lecuyer E. The many functions of mRNA localization during normal development and disease: from pillar to post. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(6):781-96.
58. van Eeden F, St Johnston D. The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(4):396-404.
59. Jambor H, Mueller S, Bullock SL, Ephrussi A. A stem-loop structure directs oskar mRNA to microtubule minus ends. *RNA (New York, NY).* 2014;20(4):429-39.
60. Kugler JM, Lasko P. Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Fly (Austin).* 2009;3(1):15-28.
61. MacDougall N, Clark A, MacDougall E, Davis I. *Drosophila* gurken (TGF α) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps. *Developmental cell.* 2003;4(3):307-19.
62. Nilson LA, Schüpbach T. EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 1999;44:203-43.
63. Deshler JO, Highett MI, Abramson T, Schnapp BJ. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Current biology : CB.* 1998;8(9):489-96.
64. Schnapp BJ, Arn EA, Deshler JO, Highett MI. RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Semin Cell Dev Biol.* 1997;8(6):529-40.
65. Medioni C, Mowry K, Besse F. Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development (Cambridge, England).* 2012;139(18):3263-76.
66. Prodon F, Pruliere G, Chenevert J, Sardet C. [Establishment and expression of embryonic axes: comparisons between different model organisms]. *Medecine sciences : M/S.* 2004;20(5):526-38.
67. Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;36:13-22.
68. Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *The Journal of cell biology.* 1997;136(6):1263-70.
69. Liao G, Simone B, Liu G. Mis-localization of Arp2 mRNA impairs persistence of directional cell migration. *Exp Cell Res.* 2011;317(6):812-22.
70. Zhang HL, Singer RH, Bassell GJ. Neurotrophin Regulation of β -Actin mRNA and Protein Localization within Growth Cones. *The Journal of cell biology.* 1999;147(1):59-70.

71. Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature*. 1998;392(6677):730-3.
72. Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(9):647-58.
73. Richter JD, Lorenz LJ. Selective translation of mRNAs at synapses. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(3):300-4.
74. Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H. RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:223-45.
75. Vessey JP, Vaccani A, Xie Y, Dahm R, Karra D, Kiebler MA, et al. Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(24):6496-508.
76. Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*. 1998;21(4):741-51.
77. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(11):3993-4001.
78. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*. 2007;8(7):533-43.
79. MacDonald PM. bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development (Cambridge, England)*. 1990;110(1):161-71.
80. Seeger MA, Kaufman TC. Molecular analysis of the bicoid gene from *Drosophila pseudoobscura*: identification of conserved domains within coding and noncoding regions of the bicoid mRNA. *The EMBO journal*. 1990;9(9):2977-87.
81. Keene JD, Tenenbaum SA. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Molecular cell*. 2002;9(6):1161-7.
82. Chin A, Lécuyer E. RNA localization: Making its way to the center stage. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(11 Pt B):2956-70.
83. Bashirullah A, Halsell SR, Cooperstock RL, Kloc M, Karaiskakis A, Fisher WW, et al. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal*. 1999;18(9):2610-20.
84. Kloc M, Zearfoss NR, Etkin LD. Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell*. 2002;108(4):533-44.
85. Forrest KM, Gavis ER. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Current biology : CB*. 2003;13(14):1159-68.

86. Dienstbier M, Li X. Bicaudal-D and its role in cargo sorting by microtubule-based motors. *Biochemical Society transactions*. 2009;37(Pt 5):1066-71.
87. Bullock SL, Ish-Horowicz D. Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature*. 2001;414(6864):611-6.
88. Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*. 2004;43(4):513-25.
89. Martin KC, Ephrussi A. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*. 2009;136(4):719-30.
90. Moore MJ. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science (New York, NY)*. 2005;309(5740):1514-8.
91. Shahbadian K, Chartrand P. Control of cytoplasmic mRNA localization. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(4):535-52.
92. Bullock SL. Translocation of mRNAs by molecular motors: think complex? *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(2):194-201.
93. Kloc M, Etkin LD. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development (Cambridge, England)*. 1995;121(2):287-97.
94. King ML, Messitt TJ, Mowry KL. Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biology of the cell*. 2005;97(1):19-33.
95. Le Hir H, Gatfield D, Braun IC, Forler D, Izaurralde E. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO reports*. 2001;2(12):1119-24.
96. Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, et al. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*. 2001;31(2):261-75.
97. Hill MA, Gunning P. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *The Journal of cell biology*. 1993;122(4):825-32.
98. Bergsten SE, Gavis ER. Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(4):659-69.
99. Zaessinger S, Busseau I, Simonelig M. Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development (Cambridge, England)*. 2006;133(22):4573-83.
100. Semotok JL, Luo H, Cooperstock RL, Karaiskakis A, Vari HK, Smibert CA, et al. *Drosophila* maternal Hsp83 mRNA destabilization is directed by multiple SMAUG recognition elements in the open reading frame. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(22):6757-72.
101. Semotok JL, Westwood JT, Goldman AL, Cooperstock RL, Lipshitz HD. Measuring mRNA stability during early *Drosophila* embryogenesis. *Methods Enzymol*. 2008;448:299-334.
102. 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;103(3):435-47.

103. Fromm L, Rhode M. Neuregulin-1 induces expression of Egr-1 and activates acetylcholine receptor transcription through an Egr-1-binding site. *Journal of molecular biology*. 2004;339(3):483-94.
104. Simon AM, Hoppe P, Burden SJ. Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development (Cambridge, England)*. 1992;114(3):545-53.
105. Schroeder MD, Pearce M, Fak J, Fan H, Unnerstall U, Emberly E, et al. Transcriptional control in the segmentation gene network of *Drosophila*. *PLoS Biol*. 2004;2(9):E271.
106. Hou HY, Heffer A, Anderson WR, Liu J, Bowler T, Pick L. Stripy Ftz target genes are coordinately regulated by Ftz-F1. *Developmental biology*. 2009;335(2):442-53.
107. Pizzinga M, Bates C, Lui J, Forte G, Morales-Polanco F, Linney E, et al. Translation factor mRNA granules direct protein synthetic capacity to regions of polarized growth. *The Journal of cell biology*. 2019;218(5):1564-81.
108. Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *The Journal of cell biology*. 1981;91(2 Pt 1):557-61.
109. Xia C, Fan J, Emanuel G, Hao J, Zhuang X. Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(39):19490-9.
110. Gilmore R, Walter P, Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *The Journal of cell biology*. 1982;95(2 Pt 1):470-7.
111. Schmid M, Jaedicke A, Du TG, Jansen RP. Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Current biology : CB*. 2006;16(15):1538-43.
112. Chouaib R, Safieddine A, Pichon X, Imbert A, Kwon OS, Samacoits A, et al. A Dual Protein-mRNA Localization Screen Reveals Compartmentalized Translation and Widespread Co-translational RNA Targeting. *Developmental cell*. 2020;54(6):773-91.e5.
113. Gadir N, Haim-Vilmovsky L, Kraut-Cohen J, Gerst JE. Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, NY)*. 2011;17(8):1551-65.
114. Zipor G, Haim-Vilmovsky L, Gelin-Licht R, Gadir N, Brocard C, Gerst JE. Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(47):19848-53.
115. Cox LJ, Hengst U, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Jaffrey SR. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nature cell biology*. 2008;10(2):149-59.
116. Hochberg-Laufer H, Schwed-Gross A, Neugebauer KM, Shav-Tal Y. Uncoupling of nucleocytoplasmic RNA export and localization during stress. *Nucleic acids research*. 2019;47(9):4778-97.

117. Nussbacher JK, Tabet R, Yeo GW, Lagier-Tourenne C. Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions. *Neuron*. 2019;102(2):294-320.
118. Liu-Yesucevitz L, Bassell GJ, Gitler AD, Hart AC, Klann E, Richter JD, et al. Local RNA translation at the synapse and in disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(45):16086-93.
119. Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*. 2008;60(2):201-14.
120. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*. 2011;146(2):247-61.
121. Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*. 2001;107(4):489-99.
122. Dichtenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Developmental cell*. 2008;14(6):926-39.
123. Kao DI, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(35):15601-6.
124. Conlon EG, Lu L, Sharma A, Yamazaki T, Tang T, Shneider NA, et al. The C9ORF72 GGGGCC expansion forms RNA G-quadruplex inclusions and sequesters hnRNP H to disrupt splicing in ALS brains. *eLife*. 2016;5.
125. Schludi MH, Edbauer D. Targeting RNA G-quadruplexes as new treatment strategy for C9orf72 ALS/FTD. *EMBO Mol Med*. 2018;10(1):4-6.
126. Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2010;24(5):375-98.
127. Ji AL, Zhang X, Chen WW, Huang WJ. Recent perspectives of metabolic alterations in neurological disorders. *J Neurosurg Sci*. 2017;61(6):689-90.
128. Sephton CF, Cenik C, Kucukural A, Dammer EB, Cenik B, Han Y, et al. Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(2):1204-15.
129. Bovaird S, Patel D, Padilla JA, Lécuyer E. Biological functions, regulatory mechanisms, and disease relevance of RNA localization pathways. *FEBS letters*. 2018;592(17):2948-72.
130. Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W. Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain research*. 2012;1462:81-92.
131. Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, et al. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell*. 2008;133(4):585-600.
132. Fallini C, Zhang H, Su Y, Silani V, Singer RH, Rossoll W, et al. The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of

- poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(10):3914-25.
133. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, et al. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of cell biology*. 2003;163(4):801-12.
 134. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science (New York, NY)*. 1992;255(5049):1253-5.
 135. Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell*. 2009;136(4):777-93.
 136. Wang ET, Cody NA, Jog S, Biancolella M, Wang TT, Treacy DJ, et al. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell*. 2012;150(4):710-24.
 137. Nousiainen HO, Kestilä M, Pakkasjärvi N, Honkala H, Kuure S, Tallila J, et al. Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease. *Nat Genet*. 2008;40(2):155-7.
 138. Johnson C, Primorac D, McKinstry M, McNeil J, Rowe D, Lawrence JB. Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *The Journal of cell biology*. 2000;150(3):417-32.
 139. Bergers G, Hanahan D. Cell factories for fighting cancer. *Nat Biotechnol*. 2001;19(1):20-1.
 140. Huang L, Xu Y, Yu W, Li Y, Chu L, Dong J, et al. Effect of Robo1 on retinal pigment epithelial cells and experimental proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(6):3193-204.
 141. Lelièvre SA. Tissue polarity-dependent control of mammary epithelial homeostasis and cancer development: an epigenetic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(1):49-63.
 142. Nagaoka K, Udagawa T, Richter JD. CPEB-mediated ZO-1 mRNA localization is required for epithelial tight-junction assembly and cell polarity. *Nature communications*. 2012;3:675.
 143. Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Corrigendum to "Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer" [*Eur J Cancer* 40 (18) (2004) 2717-2725]. *Eur J Cancer*. 2018;88:115-6.
 144. Kim PY, Tan O, Liu B, Trahair T, Liu T, Haber M, et al. High TDP43 expression is required for TRIM16-induced inhibition of cancer cell growth and correlated with good prognosis of neuroblastoma and breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2016;374(2):315-23.
 145. Weihl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, et al. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(10):1186-9.
 146. Erickson SL, Lykke-Andersen J. Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 3):293-7.

147. Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, et al. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2006;5(4):635-51.
148. Krichevsky AM, Kosik KS. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron*. 2001;32(4):683-96.
149. Ji H, Chen M, Greening DW, He W, Rai A, Zhang W, et al. Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures. *PLoS one*. 2014;9(10):e110314.
150. Sossin WS, DesGroseillers L. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2006;7(12):1581-9.
151. Rajgor D, Shanahan CM. RNA granules and cytoskeletal links. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(4):1206-10.
152. Panas MD, Ivanov P, Anderson P. Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *The Journal of cell biology*. 2016;215(3):313-23.
153. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(1):9-22.
154. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(10):494-506.
155. Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, et al. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of cell biology*. 2003;160(6):823-31.
156. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell*. 2009;36(6):932-41.
157. Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science (New York, NY)*. 2003;300(5620):805-8.
158. Balagopal V, Parker R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(3):403-8.
159. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology*. 2005;169(6):871-84.
160. Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA (New York, NY)*. 2005;11(4):371-82.
161. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology*. 2005;7(7):719-23.
162. Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a012286.
163. Protter DSW, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in cell biology*. 2016;26(9):668-79.

164. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(4):213-28.
165. Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(7):385-93.
166. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol*. 2011;33(5):455-67.
167. Le MT, Hamar P, Guo C, Basar E, Perdigão-Henriques R, Balaj L, et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5109-28.
168. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, Kapogiannis D, Gorospe M. RNA in extracellular vesicles. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2017;8(4).
169. Lefebvre FA, Benoit Bouvrette LP, Perras L, Blanchet-Cohen A, Garnier D, Rak J, et al. Comparative transcriptomic analysis of human and *Drosophila* extracellular vesicles. *Scientific reports*. 2016;6:27680.
170. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 2009;136(4):731-45.
171. Goss DJ, Kleiman FE. Poly(A) binding proteins: are they all created equal? *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2013;4(2):167-79.
172. Smith RW, Blee TK, Gray NK. Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(4):1229-37.
173. Gorgoni B, Gray NK. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2004;3(2):125-41.
174. Tourrière H, Chebli K, Tazi J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*. 2002;84(8):821-37.
175. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution--trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 2014;157(1):77-94.
176. Behm-Ansmant I, Gatfield D, Rehwinkel J, Hilgers V, Izaurralde E. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal*. 2007;26(6):1591-601.
177. Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell*. 2007;25(5):635-46.
178. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:351-79.
179. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610.
180. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(10):775-89.

181. Ito KK, Watanabe K, Kitagawa D. The Emerging Role of ncRNAs and RNA-Binding Proteins in Mitotic Apparatus Formation. *Noncoding RNA*. 2020;6(1).
182. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(2):113-26.
183. Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W, Khabar KS. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic acids research*. 2001;29(1):246-54.
184. Mazan-Mamczarz K, Galbán S, López de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, et al. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8354-9.
185. Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, et al. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(3):760-9.
186. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research*. 2005;33(22):7138-50.
187. Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal*. 2004;23(15):3092-102.
188. Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(Pt 6):963-9.
189. Iadevaia V, Gerber AP. Combinatorial Control of mRNA Fates by RNA-Binding Proteins and Non-Coding RNAs. *Biomolecules*. 2015;5(4):2207-22.
190. Timchenko NA, Wang GL, Timchenko LT. RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(21):20549-57.
191. Vlasova IA, Bohjanen PR. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA biology*. 2008;5(4):201-7.
192. Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(9):18999-9024.
193. Bekenstein U, Soreq H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: from structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Molecular and cellular neurosciences*. 2013;56:436-46.
194. Daniel C, Behm M, Öhman M. The role of Alu elements in the cis-regulation of RNA processing. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(21):4063-76.
195. Karaa ZS, Iacovoni JS, Bastide A, Lacazette E, Touriol C, Prats H. The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16. *RNA (New York, NY)*. 2009;15(2):249-54.
196. Weskamp K, Barmada SJ. RNA Degradation in Neurodegenerative Disease. *Adv Neurobiol*. 2018;20:103-42.

197. Hershey JW. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:717-55.
198. Pain VM. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *European journal of biochemistry.* 1996;236(3):747-71.
199. Kapp LD, Lorsch JR. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:657-704.
200. Sachs AB, Davis RW. The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell.* 1989;58(5):857-67.
201. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development.* 2005;19(1):104-13.
202. Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 2002;299(1-2):1-34.
203. Algire MA, Lorsch JR. Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10(5):480-6.
204. Maag D, Fekete CA, Gryczynski Z, Lorsch JR. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Molecular cell.* 2005;17(2):265-75.
205. Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature.* 1998;394(6696):854-9.
206. Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* 2000;403(6767):332-5.
207. Taylor DJ, Nilsson J, Merrill AR, Andersen GR, Nissen P, Frank J. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *The EMBO journal.* 2007;26(9):2421-31.
208. Rodnina MV. Long-range signalling in activation of the translational GTPase EF-Tu. *The EMBO journal.* 2009;28(6):619-20.
209. Blin J, Ricci EP. [An intimate look at the viral replication cycle through ribosome profiling]. *Medecine sciences : M/S.* 2016;32(10):849-60.
210. Lykke-Andersen J, Bennett EJ. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *The Journal of cell biology.* 2014;204(4):467-76.
211. Amrani N, Sachs MS, Jacobson A. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2006;7(6):415-25.
212. Conti E, Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(3):316-25.
213. Lejeune F, Maquat LE. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(3):309-15.
214. Durand S, Franks TM, Lykke-Andersen J. Hyperphosphorylation amplifies UPF1 activity to resolve stalls in nonsense-mediated mRNA decay. *Nature communications.* 2016;7:12434.

215. Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, et al. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development*. 2006;20(3):355-67.
216. Hosoda N, Kim YK, Lejeune F, Maquat LE. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(10):893-901.
217. Harigaya Y, Parker R. No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2010;1(1):132-41.
218. Doma MK, Parker R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature*. 2006;440(7083):561-4.
219. Tsuboi T, Kuroha K, Kudo K, Makino S, Inoue E, Kashima I, et al. Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Molecular cell*. 2012;46(4):518-29.
220. Chen L, Muhlrads D, Hauryliuk V, Cheng Z, Lim MK, Shyp V, et al. Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(10):1233-40.
221. Inada T. Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1829(6-7):634-42.
222. Pisareva VP, Skabkin MA, Hellen CU, Pestova TV, Pisarev AV. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *The EMBO journal*. 2011;30(9):1804-17.
223. Klauer AA, van Hoof A. Degradation of mRNAs that lack a stop codon: a decade of nonstop progress. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2012;3(5):649-60.
224. Saito S, Hosoda N, Hoshino S. The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(24):17832-43.
225. Bashkurov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *The Journal of cell biology*. 1997;136(4):761-73.
226. Anderson JS, Parker RP. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *The EMBO journal*. 1998;17(5):1497-506.
227. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):222-31.
228. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(4):1286-90.
229. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:333-74.

230. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85.
231. Meijer L. Le cycle cellulaire et sa régulation. 2003.
232. Pines J, Lafont F. Web alert. Cell differentiation and cell multiplication. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(6):657-8.
233. Nigg EA. Cell cycle regulation by protein kinases and phosphatases. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2001(34):19-46.
234. Guertin DA, Trautmann S, McCollum D. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(2):155-78.
235. Liu X, Liu X, Wang H, Dou Z, Ruan K, Hill DL, et al. Phase separation drives decision making in cell division. *The Journal of biological chemistry.* 2020;295(39):13419-31.
236. Nurse P. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem.* 2002;3(7):596-603.
237. Cho RJ, Huang M, Campbell MJ, Dong H, Steinmetz L, Sapinoso L, et al. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet.* 2001;27(1):48-54.
238. 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. *Molecular biology of the cell.* 2002;13(6):1977-2000.
239. Aviner R, Geiger T, Elroy-Stein O. Novel proteomic approach (PUNCH-P) reveals cell cycle-specific fluctuations in mRNA translation. *Genes & development.* 2013;27(16):1834-44.
240. Lane KR, Yu Y, Lackey PE, Chen X, Marzluff WF, Cook JG. Cell cycle-regulated protein abundance changes in synchronously proliferating HeLa cells include regulation of pre-mRNA splicing proteins. *PloS one.* 2013;8(3):e58456.
241. Stumpf CR, Moreno MV, Olshen AB, Taylor BS, Ruggero D. The translational landscape of the mammalian cell cycle. *Molecular cell.* 2013;52(4):574-82.
242. Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2006;7(9):644-56.
243. Baker DJ, Dawlaty MM, Galardy P, van Deursen JM. Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(5):589-600.
244. Novoa I, Gallego J, Ferreira PG, Mendez R. Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. *Nature cell biology.* 2010;12(5):447-56.
245. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-66.
246. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2007;8(2):149-60.
247. Stearns T, Kirschner M. In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell.* 1994;76(4):623-37.

248. Richter JD, Klann E. Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes & development*. 2009;23(1):1-11.
249. Qin X, Sarnow P. Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(14):13721-8.
250. Kronja I, Orr-Weaver TL. Translational regulation of the cell cycle: when, where, how and why? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1584):3638-52.
251. Yuan Z, Sanders AJ, Ye L, Wang Y, Jiang WG. Knockdown of human antigen R reduces the growth and invasion of breast cancer cells in vitro and affects expression of cyclin D1 and MMP-9. *Oncol Rep*. 2011;26(1):237-45.
252. Petry S. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:659-83.
253. Sepulveda G, Antkowiak M, Brust-Mascher I, Mahe K, Ou T, Castro NM, et al. Co-translational protein targeting facilitates centrosomal recruitment of PCNT during centrosome maturation in vertebrates. *eLife*. 2018;7.
254. Luo Y, Ahmad E, Liu ST. MAD1: Kinetochore Receptors and Catalytic Mechanisms. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6:51.
255. Prosser SL, Pelletier L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(3):187-201.
256. Alliegro MC. The centrosome and spindle as a ribonucleoprotein complex. *Chromosome Res*. 2011;19(3):367-76.
257. Messier V, Zenklusen D, Michnick SW. A nutrient-responsive pathway that determines M phase timing through control of B-cyclin mRNA stability. *Cell*. 2013;153(5):1080-93.
258. Allan LA, Camacho Reis M, Ciossani G, Huis In 't Veld PJ, Wohlgemuth S, Kops GJ, et al. Cyclin B1 scaffolds MAD1 at the kinetochore corona to activate the mitotic checkpoint. *The EMBO journal*. 2020;39(12):e103180.
259. Lambert JD, Nagy LM. Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages. *Nature*. 2002;420(6916):682-6.
260. Kingsley EP, Chan XY, Duan Y, Lambert JD. Widespread RNA segregation in a spiralian embryo. *Evolution & development*. 2007;9(6):527-39.
261. Tanenbaum ME, Stern-Ginossar N, Weissman JS, Vale RD. Regulation of mRNA translation during mitosis. *eLife*. 2015;4.
262. Emerman AB, Jambhekar A, Blower MD. Identification and Characterization of Mitotic Spindle-Localized Transcripts. *Methods Mol Biol*. 2016;1413:303-24.
263. Spana EP, Doe CQ. The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*. 1995;121(10):3187-95.
264. Groen AC, Cameron LA, Coughlin M, Miyamoto DT, Mitchison TJ, Ohi R. XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. *Current biology : CB*. 2004;14(20):1801-11.

265. Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, et al. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(6):2262-76.
266. Kouprina N, Pavlicek A, Collins NK, Nakano M, Noskov VN, Ohzeki J, et al. The microcephaly ASPM gene is expressed in proliferating tissues and encodes for a mitotic spindle protein. *Human molecular genetics*. 2005;14(15):2155-65.
267. Radulescu AE, Cleveland DW. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends in cell biology*. 2010;20(4):214-22.
268. Hussain S, Benavente SB, Nascimento E, Dragoni I, Kurowski A, Gillich A, et al. The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *The Journal of cell biology*. 2009;186(1):27-40.
269. Suprenant KA. Microtubules, ribosomes, and RNA: evidence for cytoplasmic localization and translational regulation. *Cell motility and the cytoskeleton*. 1993;25(1):1-9.
270. Liska AJ, Popov AV, Sunyaev S, Coughlin P, Habermann B, Shevchenko A, et al. Homology-based functional proteomics by mass spectrometry: application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome. *Proteomics*. 2004;4(9):2707-21.
271. Mazia D, Dan K. The Isolation and Biochemical Characterization of the Mitotic Apparatus of Dividing Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1952;38(9):826-38.
272. Salmon ED, Begg DA. Functional implications of cold-stable microtubules in kinetochore fibers of insect spermatocytes during anaphase. *The Journal of cell biology*. 1980;85(3):853-65.
273. Tirián L, Hlavanda E, Oláh J, Horváth I, Orosz F, Szabó B, et al. TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(24):13976-81.
274. Tokési N, Lehotzky A, Horváth I, Szabó B, Oláh J, Lau P, et al. TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(23):17896-906.
275. Stojic L, Lun ATL, Mascalchi P, Ernst C, Redmond AM, Mangei J, et al. A high-content RNAi screen reveals multiple roles for long noncoding RNAs in cell division. *Nature communications*. 2020;11(1):1851.
276. Mitchell SF, Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Molecular cell*. 2014;54(4):547-58.
277. Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(5):327-41.
278. Singh G, Pratt G, Yeo GW, Moore MJ. The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:325-54.
279. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*. 2014;15(12):829-45.

280. Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(6):479-90.
281. Oubridge C, Ito N, Evans PR, Teo CH, Nagai K. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*. 1994;372(6505):432-8.
282. Finn RD, Mistry J, Schuster-Böckler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, et al. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D247-51.
283. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz HR, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*. 2008;36(Database issue):D281-8.
284. Backe PH, Messias AC, Ravelli RB, Sattler M, Cusack S. X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure*. 2005;13(7):1055-67.
285. De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet*. 1993;3(1):31-5.
286. Grishin NV. KH domain: one motif, two folds. *Nucleic acids research*. 2001;29(3):638-43.
287. Ryter JM, Schultz SC. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *The EMBO journal*. 1998;17(24):7505-13.
288. Wu H, Lima WF, Zhang H, Fan A, Sun H, Crooke ST. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(17):17181-9.
289. Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Graille M, van Tilbeurgh H, Leeper TC, Godin KS, et al. A new alpha-helical extension promotes RNA binding by the dsRBD of Rnt1p RNase III. *The EMBO journal*. 2004;23(13):2468-77.
290. Stefl R, Xu M, Skrisovska L, Emeson RB, Allain FH. Structure and specific RNA binding of ADAR2 double-stranded RNA binding motifs. *Structure*. 2006;14(2):345-55.
291. Searles MA, Lu D, Klug A. The role of the central zinc fingers of transcription factor IIIA in binding to 5 S RNA. *Journal of molecular biology*. 2000;301(1):47-60.
292. De J, Lai WS, Thorn JM, Goldsworthy SM, Liu X, Blackwell TK, et al. Identification of four CCCH zinc finger proteins in *Xenopus*, including a novel vertebrate protein with four zinc fingers and severely restricted expression. *Gene*. 1999;228(1-2):133-45.
293. Jankowsky E, Harris ME. Specificity and nonspecificity in RNA-protein interactions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(9):533-44.
294. Kiledjian M, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO journal*. 1992;11(7):2655-64.
295. Weiss MA, Narayana N. RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers*. 1998;48(2-3):167-80.

296. Storchová Z, Breneman A, Cande J, Dunn J, Burbank K, O'Toole E, et al. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*. 2006;443(7111):541-7.
297. Sönnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, et al. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2005;434(7032):462-9.
298. Kittler R, Buchholz F. Functional genomic analysis of cell division by endoribonuclease-prepared siRNAs. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2005;4(4):564-7.
299. Neumann B, Walter T, Hériché JK, Bulkescher J, Erfle H, Conrad C, et al. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*. 2010;464(7289):721-7.
300. David R. Cell cycle: dissecting mitosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(5):310.
301. McKinley KL, Cheeseman IM. Large-Scale Analysis of CRISPR/Cas9 Cell-Cycle Knockouts Reveals the Diversity of p53-Dependent Responses to Cell-Cycle Defects. *Developmental cell*. 2017;40(4):405-20.e2.
302. Koseoglu MM, Graves LM, Marzluff WF. Phosphorylation of threonine 61 by cyclin a/Cdk1 triggers degradation of stem-loop binding protein at the end of S phase. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(14):4469-79.
303. Marzluff WF, Koreski KP. Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends Genet*. 2017;33(10):745-59.
304. Skaar JR, Pagano M. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(6):816-24.
305. Braunstein I, Miniowitz S, Moshe Y, Hershko A. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(12):4870-5.
306. Ge S, Skaar JR, Pagano M. APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009;8(1):167-71.
307. Müller H, Schmidt D, Steinbrink S, Mirgorodskaya E, Lehmann V, Habermann K, et al. Proteomic and functional analysis of the mitotic *Drosophila* centrosome. *The EMBO journal*. 2010;29(19):3344-57.
308. Santamaria A, Nagel S, Sillje HHW, Nigg EA. The spindle protein CHICA mediates localization of the chromokinesin Kid to the mitotic spindle. *Current biology : CB*. 2008;18(10):723-9.
309. Sauer G, Korner R, Hanisch A, Ries A, Nigg EA, Sillje HH. Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2005;4(1):35-43.
310. Sillje HH, Nigg EA. Purification of mitotic spindles from cultured human cells. *Methods (San Diego, Calif)*. 2006;38(1):25-8.
311. Steinhäuser K, Klöble P, Kreis NN, Ritter A, Friemel A, Roth S, et al. Deficiency of RITA results in multiple mitotic defects by affecting microtubule dynamics. *Oncogene*. 2017;36(15):2146-59.

312. Kreis NN, Steinhäuser K, Ritter A, Klöble P, Hoock SC, Roth S, et al. Potential involvement of RITA in the activation of Aurora A at spindle poles during mitosis. *Oncogene*. 2019;38(22):4199-214.
313. Wacker SA, Alvarado C, von Wichert G, Knippschild U, Wiedenmann J, Clauss K, et al. RITA, a novel modulator of Notch signalling, acts via nuclear export of RBP-J. *The EMBO journal*. 2011;30(1):43-56.
314. Jao LE, Akef A, Wentz SR. A role for Gle1, a regulator of DEAD-box RNA helicases, at centrosomes and basal bodies. *Molecular biology of the cell*. 2017;28(1):120-7.
315. Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trepanier V, Mollet S, Frechina C, et al. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Stauf1. *Nucleic acids research*. 2014;42(12):7867-83.
316. Ghram M, Bonnet-Magnaval F, Hotea DI, Doran B, Ly S, DesGroseillers L. Stauf1 is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation Via the Control of E2F1 Expression. *Journal of molecular biology*. 2020;432(13):3881-97.
317. St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C. Stauf1, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell*. 1991;66(1):51-63.
318. Schupbach T, Wieschaus E. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Developmental biology*. 1986;113(2):443-8.
319. Ramasamy S, Wang H, Quach HN, Sampath K. Zebrafish Stauf1 and Stauf2 are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Developmental biology*. 2006;292(2):393-406.
320. Allison R, Czaplinski K, Git A, Adegbenro E, Stennard F, Houlston E, et al. Two distinct Stauf1 isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *RNA (New York, NY)*. 2004;10(11):1751-63.
321. DesGroseillers L, Lemieux N. Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1996;36(3):527-9.
322. Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* stauf1 protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics*. 1999;62(1):113-8.
323. Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian stauf1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(3):2220-30.
324. Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. Stauf2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 16):3285-95.
325. Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, et al. Isolation and characterization of Stauf1-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):2100-5.

326. Monshausen M, Gehring NH, Kosik KS. The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular medicine*. 2004;6(2-3):127-44.
327. St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(22):10979-83.
328. Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, et al. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(1):288-97.
329. Micklem DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *The EMBO journal*. 2000;19(6):1366-77.
330. Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron*. 2001;32(3):463-75.
331. Martel C, Macchi P, Furic L, Kiebler MA, Desgroseillers L. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *The Biochemical journal*. 2006;393(Pt 1):245-54.
332. Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(9):2945-53.
333. 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;519(7544):491-4.
334. Duchaine T, Wang HJ, Luo M, Steinberg SV, Nabi IR, DesGroseillers L. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(15):5592-601.
335. Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal*. 2002;365(Pt 3):817-24.
336. Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 4):563-73.
337. Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, et al. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(1):405-20.
338. Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(3):2212-9.
339. Chatel-Chaix L, Clement JF, Martel C, Beriault V, Gatignol A, DesGroseillers L, et al. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein

complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(7):2637-48.

340. Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, Desgroseillers L. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology*. 2008;5:41.
341. Chatel-Chaix L, Abrahamyan L, Frechina C, Mouland AJ, DesGroseillers L. The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *Journal of virology*. 2007;81(12):6216-30.
342. Abrahamyan LG, Chatel-Chaix L, Ajamian L, Milev MP, Monette A, Clement JF, et al. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 3):369-83.
343. Rao S, Hassine S, Monette A, Amorim R, DesGroseillers L, Mouland AJ. HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles. *RNA (New York, NY)*. 2019;25(6):727-36.
344. Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science (New York, NY)*. 1998;279(5350):519-26.
345. Hirokawa N, Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):201-14.
346. Kiebler MA, DesGroseillers L. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*. 2000;25(1):19-28.
347. Monshausen M, Putz U, Rehbein M, Schweizer M, DesGroseillers L, Kuhl D, et al. Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *Journal of neurochemistry*. 2001;76(1):155-65.
348. Takahashi K, Ishii K, Yamashita M. Staufen1, Kinesin1 and microtubule function in cyclin B1 mRNA transport to the animal polar cytoplasm of zebrafish oocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;503(4):2778-83.
349. Yoon YJ, Mowry KL. Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development (Cambridge, England)*. 2004;131(13):3035-45.
350. Rao SR, Flores-Rodriguez N, Page SL, Wong C, Robinson PJ, Chircop M. The Clathrin-dependent Spindle Proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2016;15(8):2537-53.
351. Bonner MK, Poole DS, Xu T, Sarkeshik A, Yates JR, 3rd, Skop AR. Mitotic spindle proteomics in Chinese hamster ovary cells. *PloS one*. 2011;6(5):e20489.
352. Gowravaram M, Schwarz J, Khilji SK, Urlaub H, Chakrabarti S. Insights into the assembly and architecture of a Staufen-mediated mRNA decay (SMD)-competent mRNP. *Nature communications*. 2019;10(1):5054.
353. Laver JD, Li X, Ancevicus K, Westwood JT, Smibert CA, Morris QD, et al. Genome-wide analysis of Staufen-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic acids research*. 2013;41(20):9438-60.

354. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*. 2013;493(7431):231-5.
355. Ricci EP, Kucukural A, Cenik C, Mercier BC, Singh G, Heyer EE, et al. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(1):26-35.
356. 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 & development*. 2013;27(13):1495-510.
357. Kretz M. TINCR, staufen1, and cellular differentiation. *RNA biology*. 2013;10(10):1597-601.
358. Heraud-Farlow JE, Kiebler MA. The multifunctional Staufen proteins: conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*. 2014;37(9):470-9.
359. Ravel-Chapuis A, Belanger G, Yadava RS, Mahadevan MS, DesGroseillers L, Cote J, et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology*. 2012;196(6):699-712.
360. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 2001;29(1):40-7.
361. Bachand F, Triki I, Autexier C. Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic acids research*. 2001;29(16):3385-93.
362. Le S, Sternglanz R, Greider CW. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(3):999-1010.
363. Ephrussi A, Dickinson LK, Lehmann R. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*. 1991;66(1):37-50.
364. Weil TT, Xanthakis D, Parton R, Dobbie I, Rabouille C, Gavis ER, et al. Distinguishing direct from indirect roles for bicoid mRNA localization factors. *Development (Cambridge, England)*. 2010;137(1):169-76.
365. Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature*. 1998;391(6669):792-5.
366. Schupbach T, Wieschaus E. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Roux's archives of developmental biology : the official organ of the EDBO*. 1986;195(5):302-17.
367. Gautrey H, McConnell J, Lako M, Hall J, Hesketh J. Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783(10):1935-42.
368. Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, DesGroseillers L, Maquat LE. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal*. 2007;26(11):2670-81.
369. Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, et al. A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and

- dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16374-9.
370. Zhang J, Houston DW, King ML, Payne C, Wylie C, Heasman J. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1998;94(4):515-24.
 371. Joseph EM, Melton DA. Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)*. 1998;125(14):2677-85.
 372. Hillebrand J, Barbee SA, Ramaswami M. P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *TheScientificWorldJournal*. 2007;7:178-90.
 373. Kress TL, Yoon YJ, Mowry KL. Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *The Journal of cell biology*. 2004;165(2):203-11.
 374. Oleynikov Y, Singer RH. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Current biology : CB*. 2003;13(3):199-207.
 375. 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. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(9):2896-907.
 376. Belanger G, Stocksley MA, Vandromme M, Schaeffer L, Furic L, DesGroseillers L, et al. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(3):669-77.
 377. Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*. 2002;36(3):507-19.
 378. Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, et al. Translocation of RNA granules in living neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(24):7812-20.
 379. Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Moulard AJ, DesGroseillers L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic acids research*. 2005;33(15):4797-812.
 380. White R, Gonsior C, Kramer-Albers EM, Stohr N, Huttelmaier S, Trotter J. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *The Journal of cell biology*. 2008;181(4):579-86.
 381. Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, et al. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*. 2005;438(7067):512-5.
 382. Perycz M, Urbanska AS, Krawczyk PS, Parobczak K, Jaworski J. Zipcode binding protein 1 regulates the development of dendritic arbors in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(14):5271-85.
 383. Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, et al. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*. 2001;107(4):477-87.

384. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009;7(4):147-54.
385. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011;12(2):99-110.
386. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*. 2011;12(1):19-31.
387. Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D, Kindler S. Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(20):8818-29.
388. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science (New York, NY)*. 1996;274(5293):1678-83.
389. Besse F, Ephrussi A. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(12):971-80.
390. Goldstrohm AC, Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(4):337-44.
391. 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;120(2):195-208.
392. Moon BS, Bai J, Cai M, Liu C, Shi J, Lu W. Kruppel-like factor 4-dependent Staufen1-mediated mRNA decay regulates cortical neurogenesis. *Nature communications*. 2018;9(1):401.
393. Lucas BA, Lavi E, Shiue L, Cho H, Katzman S, Miyoshi K, et al. Evidence for convergent evolution of SINE-directed Staufen-mediated mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(5):968-73.
394. Kim MY, Park J, Lee JJ, Ha DH, Kim J, Kim CG, et al. Staufen1-mediated mRNA decay induces Requiem mRNA decay through binding of Staufen1 to the Requiem 3'UTR. *Nucleic acids research*. 2014;42(11):6999-7011.
395. Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development*. 2009;23(1):54-66.
396. Cho H, Kim KM, Han S, Choe J, Park SG, Choi SS, et al. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Molecular cell*. 2012;46(4):495-506.
397. Yang C, Zheng J, Liu X, Xue Y, He Q, Dong Y, et al. Role of ANKHD1/LINC00346/ZNF655 Feedback Loop in Regulating the Glioma Angiogenesis via Staufen1-Mediated mRNA Decay. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;20:866-78.
398. de Lucas S, Oliveros JC, Chagoyen M, Ortín J. Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic acids research*. 2014;42(7):4516-26.

399. Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, NY)*. 2008;14(2):324-35.
400. Wan D, Gong Y, Qin W, Zhang P, Li J, Wei L, et al. Large-scale cDNA transfection screening for genes related to cancer development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15724-9.
401. Gandelman M, Dansithong W, Figueroa KP, Paul S, Scoles DR, Pulst SM. Staufen 1 amplifies proapoptotic activation of the unfolded protein response. *Cell Death & Differentiation*. 2020;27(10):2942-51.
402. Bonnet-Magnaval F, Philippe C, Van Den Berghe L, Prats H, Touriol C, Lacazette E. Hypoxia and ER stress promote Staufen1 expression through an alternative translation mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;479(2):365-71.
403. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):785-97.
404. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes & development*. 2002;16(2):245-56.
405. Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, et al. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(14):4684-99.
406. Xu TP, Liu XX, Xia R, Yin L, Kong R, Chen WM, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene*. 2015;34(45):5648-61.
407. Xu TP, Wang YF, Xiong WL, Ma P, Wang WY, Chen WM, et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell death & disease*. 2017;8(6):e2837.
408. Liu Z, Chen Z, Fan R, Jiang B, Chen X, Chen Q, et al. Over-expressed long noncoding RNA HOXA11-AS promotes cell cycle progression and metastasis in gastric cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):82.
409. 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. *Nature communications*. 2016;7:13875.
410. Sakurai M, Shiromoto Y, Ota H, Song C, Kossenkov AV, Wickramasinghe J, et al. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*. 2017;24(6):534-43.
411. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D512-20.
412. Dionisio-Vicuña MN, Gutiérrez-López TY, Adame-García SR, Vázquez-Prado J, Reyes-Cruz G. VPS28, an ESCRT-I protein, regulates mitotic spindle organization via Gβγ, EG5 and TPX2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(7):1012-22.

413. Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WI. Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(29):12889-94.
414. Petsalaki E, Zachos G. Novel ESCRT functions at kinetochores. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(3):299-300.
415. Petsalaki E, Dandoulaki M, Zachos G. The ESCRT protein Chmp4c regulates mitotic spindle checkpoint signaling. *The Journal of cell biology*. 2018;217(3):861-76.
416. Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, et al. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature*. 2015;522(7555):231-5.