

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude de CHES1/FOXN3, un facteur de transcription de
la famille des forkheads, dans la régulation du cycle
cellulaire et de la sénescence**

par

Laurent Doucet

Programmes de Biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biologie moléculaire

Août, 2007

© Laurent Doucet, 2007



Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Étude de CHES1/FOXN3, un facteur de transcription de la famille des forkheads, dans la
régulation du cycle cellulaire et de la sénescence

présenté par :

Laurent Doucet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, président-rapporteur

Gerardo Ferbeyre, directeur de recherche

Gilbert Bernier, membre du jury

RÉSUMÉ

La sénescence est un arrêt de croissance irréversible accompagnée d'un changement morphologique et gouverné par un programme d'expression génétique spécifique. La sénescence peut être induite *in vitro* et *in vivo* par plusieurs oncogènes tels que RasV12 et STAT5A1*6. Malgré tout, les questions concernant les mécanismes régulant ce processus cellulaire complexe sont plus nombreuses que les réponses. Ainsi, dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs du processus de la sénescence, nous avons comparé le profil d'expression génétique de cellules sénescents induite par STAT5 à celui de cellules normales. Nous avons identifié un facteur de transcription, CHES1/FOXN3, qui était augmenté dans les cellules sénescents. Nous avons donc posé l'hypothèse que CHES1 pouvait réguler le cycle cellulaire et ainsi participer au processus de la sénescence. Nous avons démontré, par transfection, que CHES1 pouvait diminuer la formation de colonies dans une lignée d'ostéosarcome et ce, dépendamment de son domaine de liaison à l'ADN. L'analyse de mutants de délétion nous a permis d'identifier un domaine N-terminal inhibiteur et que ce domaine était phosphorylé sur trois résidus. À l'aide d'infections rétrovirales sur des fibroblastes normaux, nous avons montré que CHES1 pouvait induire la sénescence et ce, dépendamment de la protéine p53. En comparant l'expression génétique de ces fibroblastes par "microarrays", nous avons remarqué que la plupart des gènes étaient réprimés et qu'ils étaient impliqués dans la transition G₂/M. De plus, ce profil d'expression génétique ressemblait étrangement à celui des cellules provenant de personnes âgées, ce qui coïncide avec des niveaux d'expression supérieurs de CHES1 chez les rats âgés. Puisque FOXM1 régule la transition G₂/M, qu'il est un oncogène et est un des gènes les plus diminués durant le vieillissement, nous proposons que CHES1 antagonise les fonctions de FOXM1 afin d'empêcher certains cancers, mais qu'il pourrait, en contre partie, contribuer au vieillissement.

Mots-clés : CHES1, sénescence, vieillissement, forkhead, cancer, facteur de transcription, suppression tumorale, FOXM1, transition G₂/M.

ABSTRACT

Senescence is a state of stable cell cycle arrest where cells undergo various morphological and genetic changes. Senescence can be induced *in vitro* and *in vivo* by different oncogenes such as RasV12 and STAT5A1*6. Although its relevance to tumour suppression is well established, the mechanisms governing this phenomenon are still poorly understood. Thus, in an effort to clarify this issue, we sought to identify new regulators of cellular senescence by comparing gene expression profile of STAT5-senescent cells to the one of actively growing cells. We could identify a transcription factor named CHES1/FOXN3 that was significantly up-regulated in senescent cells. We then hypothesized that CHES1 could regulate the cell cycle and hence, participate in the senescence program. We demonstrated, through transfection, that CHES1 can suppress the growth of the osteosarcoma cell line, U2OS, and that this effect depends on the forkhead DNA-binding domain. Analysis of deletion mutants of the protein allowed us to identify an amino-terminal inhibitory domain that is phosphorylated at three distinct sites. Through retroviral gene infection on normal fibroblasts, we showed that CHES1 by itself can induce senescence in a p53-dependant manner. Microarray analysis revealed CHES1 as a transcriptional repressor and a negative regulator of the G₂/M transition. Moreover, CHES1 over-expression results in a genetic profile very similar to the one of aged fibroblasts and coincides with our observation that CHES1 mRNA is increased in aged rats. Since another forkhead transcription factor, FOXM1, regulates the G₂/M transition, is drastically downregulated in aging and because he is a well established oncogene, we propose that CHES1 is the cellular antagonist of FOXM1 that act to protect cells against malignant transformation and that with time, contribute to the aging phenotype.

Keywords : CHES1, senescence, ageing, forkhead, cancer, transcription factor, tumour suppression, FOXM1, G₂/M transition

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1. Le cycle cellulaire.....	1
1.1. Les cyclines et CDKs.....	2
1.2. Les CKIs.....	3
1.3. ARF; la connexion entre p53 et Rb.....	4
CHAPITRE 2. La suppression tumorale.....	6
2.1. Les mécanismes de suppression tumorale.....	6
2.2. L'apoptose.....	7
2.3. La sénescence cellulaire.....	7
2.3.1. La sénescence répllicative et prématurée.....	8
2.3.2. La voie de p53.....	9
2.3.4. La voie de Rb.....	10
2.3.5. La sénescence et le vieillissement.....	11
CHAPITRE 3. Les facteurs de transcription forkheads.....	12
3.1 Domaines protéiques fonctionnels des forkheads.....	14
3.1.1 Domaine de liaison à l'ADN de type Forkhead.....	14
3.1.2. Les Domaines de transactivation.....	16
3.1.3. Signaux de localisation nucléaire (SLN).....	17
3.2. Les modifications post-traductionnelles.....	18

3.2.1. Les motifs de phosphorylation.....	18
3.2.2. Les motifs d'acétylation.....	20
3.2.3. L'ubiquitination.....	20
3.3. Domaines et motifs d'interaction protéiques.....	21
3.4. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle.....	22
3.5. Fonctions des forkheads.....	23
3.5.1. Survie cellulaire.....	24
3.5.2. Contrôle du cycle cellulaire.....	25
3.5.2.1. FOXM1 et le contrôle de la transition G ₂ /M.....	25
3.5.2.1.1. Foxm1 promouvoit la prolifération et ses niveaux d'expression sont régulés en fonction du cycle cellulaire.....	26
3.5.2.1.2. L'activité de Foxm1 est régulé durant le cycle cellulaire.....	27
3.5.2.1.3. Cibles transcriptionnelles de foxm1 dans la transition G ₂ /M.....	27
3.5.2.2. Les autres membres Fox.....	29
3.6. La sous-Famille FOXN.....	30
3.7. CHES1/FOXN3.....	31
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	36
RÉSULTATS.....	37
4.1 ARTICLE: REGULATION OF THE CELL CYCLE AND CELLULAR SENESCENCE BY THE FORKHEAD TRANSCRIPTION FACTOR CHES1/FOXN3.....	37
MISE EN CONTEXTE.....	37
ABSTRACT.....	39
INTRODUCTION.....	40
RESULTS AND DISCUSSION.....	42
CHES1 is a senescence-regulated gene.....	42
CHES1 regulates growth of normal and tumour cells.....	43
CHES1 localize to the nucleus dependently of two distinct nuclear localization signals (NLSs).....	44
CHES1 regulates cell growth through its DBD.....	45
CHES1 regulates G ₂ /M specific genes.....	46
CHES1 inhibits FOXM1 transactivation.....	47

MATERIALS AND METHODS.....	48
cDNAs and constructs.....	48
Cell culture.....	49
Retroviral-mediated gene transfer.....	50
Growth curve.....	50
Colony assay.....	51
Senescence-associated β -galactosidase assay.....	51
Western blots.....	51
RNA analysis, RT-PCR and real-time PCR.....	52
Microarray analysis.....	53
Luciferase assay.....	53
Fluorescence microscopy.....	53
ACKNOWLEDGEMENTS.....	54
REFERENCES.....	55
FIGURES AND LEGENDS.....	57
5. DISCUSSION.....	67
5.1. CHES1 en tant que suppresseur tumoral.....	67
5.2. Les domaines fonctionnels de CHES1.....	71
5.2.1. Efficacité différentiel des deux isoformes.....	71
5.2.2. Le domaine de liaison à l'ADN.....	72
5.2.3. Les signaux de localisation nucléaire (SLN).....	73
5.2.4. Le domaine N-terminal.....	74
5.2.4.1. Un domaine inhibiteur.....	74
5.2.4.2. Mécanisme d'inhibition du domaine N-terminal.....	78
5.3. CHES1 régule la transition G ₂ /M.....	85
5.3.1. Profil d'expression génétique des cellules surexprimant CHES1.....	85
5.3.2. CHES1 antagonise FOXM1.....	87
5.3.3. CHES1 et le vieillissement.....	90
5.4. Directions futures.....	91
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	93
BIBLIOGRAPHIE.....	94

ANNEXES.....I

ANNEXE I: MATÉRIEL ET MÉTHODES DES FIGURES PRÉSENTÉES DANS LA DISCUSSION.....I

 ADNc et constructions.....I

 Gel d'électrophorèse en deux dimensions.....I

 Immunoprécipitation.....II

 Spectrométrie de masse.....III

 ImmunobuvardageIII

ANNEXE II : ACCORD DES COAUTEURS.....V

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION ET DISCUSSION

Tableau I. Distribution chromosomique des gènes forkheads humains.13

Tableau II. Propriétés transcriptionnelles des facteurs de transcription Forkheads.19

Tableau III. Expression différentielle de CHES1 dans les différents types de cancers.....70

ARTICLE

Tableau I. CHES1 represses G₂/M specific genes.....65

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. Schéma des différentes étapes du cycle cellulaire et des points de restriction qui les contrôlent....	2
Figure 2. Mécanisme d'action de la progression en phase S.....	4
Figure 3. Synergie des membres de la famille INK4 et Cip/Kip dans la régulation de la transition en phase S.....	5
Figure 4. Rôles des voies de p53 et p16/Rb dans l'induction de la sénescence.....	11
Figure 5. Schéma du domaine forkhead.....	15
Figure 6. Alignement des séquences d'acides aminées de la partie N-terminale du domaine de liaison à l'ADN de plusieurs Forkheads.....	33

RÉSULTATS

Figure 1. CHES1 is up-regulated in oncogene-induced senescence and ageing.....	57
Figure 2. CHES1 is a negative regulator of cell growth.....	59
Figure 3. CHES1 DBD is sufficient to block cell proliferation.....	61
Figure 4. CHES1 inhibits FOXM1-dependent transactivation.....	63

DISCUSSION

Figure 7. Ches1 est rapidement dégradé par le protéasome.....	69
Figure 8. Ches1 stabilise p53.....	75
Figure 9. Le domaine amino-terminal régule la localisation cellulaire.....	77
Figure 10. Ches1 est phosphorylé en plusieurs sites.....	79

Figure 11. CHES1 est phosphorylé sur 4 sérines distinctes et une tyrosine..... 80

Figure 12. Ches1 est une protéine extrêmement conservée parmi les espèces..... 83

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A	Adénine
C	Cytosine
T	Thymidine
RNM	Résonance nucléaire magnétique
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PKB/Akt	Protein kinase B /
NLS	Nuclear localization signal
CBP	CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein
CDK	Cyclin-dependant kinase
CKI	CDK inhibitor
Cip	CDK-Interacting protein
Kip	Kinase inhibitory protein
INK4	<u>Inhibit cdk4</u>
DYRK1A	Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kianse 1A
FHA	Forkhead-associated domain
GADD45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45a
HDAC	Histone deacetylase
MH domain	Mothers against decapentaplegic homology domain
SGK	Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase
Smad	Similar to mothers against decapentaplegic
SID	Smad-interaction domain
TGF- β	Transforming growth factor β
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEN1	Multiple endocrine neoplasia type 1
SKIP	Ski-interacting protein
CHES1	Checkpoint suppressor 1
DBD	DNA binding domain
MMTC	N-(4-methyl)phenyl-O-(4-methoxy)phenyl-thionocarbamate

KLF4	Kruppel-like factor 4
HPV-16	Human papillomavirus-16
ATR	Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related
53BP1	p53-binding protein 1
Chk1	Cell cycle checkpoint kinase 1
Rad	Radiation sensitive
HU	Hydroxyurée
MMS	Méthyl méthanesulfonate
UBE2	Ubiquitin-conjugating enzyme 2
MEC1	Mitosis Entry Checkpoint 1
SNP	Single nucleotide polymorphism
5' UTR	5' untranslated region
QTL	Quantitative trait loci
Rpd3	Reduced potassium dependency 3
SIRT1	Sirtuin 1
Sin3	Switch Independent
MAD1	Mitotic arrest-deficient 1
HTLV	Human T-cell leukemia virus
MnSOD	Manganese Superoxide dismutase
DAF-16	Dauer formation-16
CENP-F	Centromeric protein F
Plk-1	Polo-like kinase 1
IGF	Insulin growth factor
SiRNA	Small interfering RNA
Cdc25B	Cell division cycle 25B
p19ARF	p19- Alternative reading frame
TFIIB	Transcription factor IIB
TBP	Tata box-binding protein
pRb	Retinoblastoma protein
NcoR	Nuclear receptor co-repressor

SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
AR	Androgen receptor
NR	Nuclear receptor
NK	Natural killer
RE	Récepteur de l'œstrogène
Mcm1	Mini chromosome maintenance 1
HOXA10	Homeobox A10
Pdx-1	Pyruvate dehydrogenase X component
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
PITX2	Paired-like homeodomain transcription factor 2
TRAMP	Transgenic adenocarcinoma mouse prostate
Mdm2	Mouse double minute 2
BCC	Basal cell carcinoma
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
CCSK	Clear cell sarcoma of the kidney
cRCC	Renal cell carcinoma
APC/C	Anaphase promoting complex/ Cyclosome
PRC1	Protein regulator of cytokinesis
PAI-1	Plaminogen activator inhibitor-1
BRRN1	Barren homolog 1
TMPO	Thymopoietin
H ₂ AX	Histone 2A variant X
siRNA	Small interfering RNA
shRNA	Short hairpin RNA
ADNc	ADN complémentaire

REMERCIEMENTS

D'abord et avant tout, je tiens à remercier mes parents, René Doucet et Rachelle Pelletier, pour leur support moral et financier inconditionnel, sans qui ces études n'auraient été possibles. Il serait difficile de passer sous silence l'implication de mon directeur de recherche dans ma formation. Son ouverture d'esprit, sa présence et son encadrement continu ainsi que la liberté d'expression qu'il m'a accordée m'auront permis de développer mon plein potentiel et de m'épanouir au niveau intellectuel. Pour cela je te remercie.

L'équipe au laboratoire aura aussi joué un rôle important dans mon développement et mon bien-être. Viviane; ta douceur, ton sens de l'humour et ta nationalité italienne me manqueront. Tu as été et sera toujours une bonne amie. Je quitte alors que la petite étudiante est devenue une sage chercheuse au potentiel inouï. Ne lâche pas.

Fred, petite girouette émotionnelle, tu as fais prendre tout leur sens aux expressions : ce n'est pas parce qu'on est petit qu'on ne peut pas être grand et c'est dans les petits pots que l'on retrouve les meilleures crèmes. Cher partenaire de hockey et de disputes inexplicables, tu auras su m'apprendre à faire confiance aux chauves et à m'inculquer l'amour. Sache qu'avec ou sans publications, tu seras toujours un de mes co-auteurs.

Vincent, il faut se rendre à l'évidence que plus ça change plus c'est pareil. Pour un deuxième diplôme universitaire de suite, tu auras été comme le frère mongol que je n'ai jamais eu. Que ce soit côte à côte au lab ou en tête-à-tête en mangeant un bon général tao, cette fois notre relation aura cependant atteint une autre étape : la proximité. J'espère que la distance qui nous séparera ces prochaines années ne saura effacer ces beaux moments. Bonne chance en biochimie clinique.

Marie-France, tu auras été comme une deuxième mère pour moi. Je parle bien sûr de ton instinct maternel qui s'est assuré que je sois repu à chaque midi. Les restes de lunches, les petits desserts inattendus et les trucs pour la cuisine ont été fort appréciés. Je

dois par contre souligner tes fous rires inexplicables qui remettent en question mon désir d'avoir quatre enfants. Marie-France, bonne chance dans tes projets futurs.

Nicolas, je te remercie du fond du cœur d'avoir été aussi persévérant et persuasif aux moments les moins opportuns afin de prendre soin de ma santé mentale et ce, malgré mes réticences. Tu avais raison, les délais de rédaction encourus sont minimes comparativement aux bienfaits d'une bonne boisson alcoolisée. Ma conscience en est sortie amochée, mais grandie et cela me servira lors de mon périple à Québec.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu des contacts, de proche ou de loin, et qui m'ont apporté un support moral et technique. Un remerciement spécial à Mario Tremblay, du temps qu'il était à son apogée comme commentateur à la soirée du hockey, pour les fameux honneurs de bleuets d'or, flétris et sans oublier le héros obscur. Ainsi, je décerne mon bleuet flétri à l'inventeur du Sudoku pour m'avoir fait perdre d'innombrables heures de recherches scientifiques. Par contre, je dédis mon bleuet d'or à l'inventeur de YouTube pour m'avoir permis de voir Vincent perdre d'innombrables heures de recherches scientifiques à regarder les "try-outs" de American idol. Trêve de plaisanteries, la palme du héros obscur revient à Vivianne Jodoin, coordonnatrice du programme de biologie moléculaire, pour son travail phénoménal et l'aide qu'elle m'a apportée lorsque des embûches "imprévisibles" se sont dressées sur mon chemin. Finalement, mon directeur de recherche tient à remercier le FRSQ pour m'avoir financé ces deux dernières années.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. Le cycle cellulaire

La caractéristique commune à toutes cellules est la division cellulaire. Ce processus complexe n'a pour but que de répliquer fidèlement le contenu du matériel génétique de façon à le transmettre également aux deux cellules filles. Le cycle de division cellulaire peut être sub-divisé en quatre étapes majeures : la phase G_1 (GAP), S, G_2 et la Mitose (M). La phase G_1 est l'intervalle dans lequel les cellules répondent aux signaux extracellulaires qui détermine si elles répliqueront leur matériel génétique (durant la phase S) et se diviseront (durant la mitose) ou si elles sortiront du cycle cellulaire dans un état de quiescence appelé G_0 (voir figure 1). Pour sa part, la phase G_2 est l'intervalle dans lequel les cellules se préparent pour la mitose. Le cycle cellulaire comporte plusieurs points de restrictions, spécifiques aux différentes étapes du cycle cellulaire, afin d'arrêter la progression dans le cycle cellulaire s'assurant ainsi du bon déroulement de ce dernier. On dénombre pas moins de sept points de restrictions dont 4 agissent durant la mitose, 2 à la barrière G_1/S et un spécifique à S/G_2 (1-3).

Le premier, nommé point de restriction en G_1 , agit à la jonction de la phase G_1/S en s'assurant que les cellules sont prêtes à répliquer leur génome, tandis que le point de restriction des centrosomes survient après une division cellulaire où les centrosomes n'ont pas été dupliqué correctement et induit un arrêt en G_1 (1). Ensuite, le point de restriction de la phase S, aussi connu comme le point restriction aux dommages à l'ADN, s'assure que le matériel génétique n'est pas endommagé. Les points de restrictions de la mitose comprennent celui de TopoII, Chfr, du fuseau mitotique et de la sortie de la mitose et agissent spécifiquement en G_2 , en prophase, en métaphase et en anaphase, spécifiquement et veille à l'intégrité du génome (voir figure 1) (3). En somme, le cycle cellulaire est le processus par lequel les cellules se divisent et doivent transiger par plusieurs étapes de contrôle de qualité contrôlées par des cascades biochimiques.

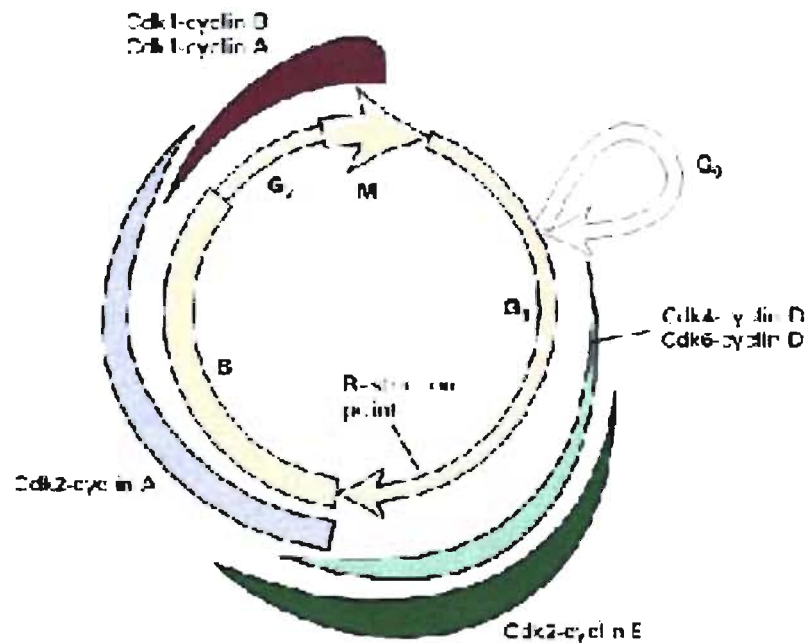


Figure 1. Schéma des différentes étapes du cycle cellulaire et des points de restriction qui les contrôlent.

1.1. Les cyclines et CDKs

La transition dans le cycle cellulaire est contrôlée par les cdk. Ces enzymes contiennent une sous-unité catalytique (cdk) et une régulatrice (cycline). On dénombre à ce jour à 11 le nombre de CDKs (1 à 11) chez l'humain (4, 5) alors que 10 cyclines (A à H, K et T) ont été identifiées. Chaque CDK s'associe spécifiquement à une cycline, dépendamment de la phase du cycle cellulaire. Classiquement, les CDK4-6 s'associent aux cyclines D et E durant la phase G₁ et déclenche la phosphorylation de la protéine Rb afin d'inhiber ces fonctions. Rb agit principalement en réprimant l'expression de gènes requis pour la synthèse de l'ADN, en liant les facteurs de transcription de la famille E2F. Ainsi, la phosphorylation de Rb perturbe son interaction avec E2F permettant l'expression de gènes requis pour la transition vers la phase S. La transition de la phase S vers G₂ est contrôlée par CDK2 lié à la cycline E dans un premier temps et à la cycline A par la suite. Finalement, la

transition de G₂ à M est dictée par CDK1 liée à la cycline A et la complétion de la mitose par CDK1 liée à la cycline B (6).

1.2. Les CKIs

Les inhibiteurs des CDKs se sub-divisent en deux grandes familles : les Cip/Kip et les INK4. La famille des Cip/Kip est composée de trois polypeptides incluant p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} qui ont tous la particularité de lier et inhiber cdk2 en complexes avec les cyclines A et E. Cependant, il est maintenant reconnu que les Cip/Kip sont requis pour l'assemblage de cdk4/6 avec la cycline D et que ces enzymes en complexe avec les Cip/Kip sont toujours catalytiquement actives. Ainsi, la progression vers la phase S est attribuable aux complexes cdk4/6 avec la cycline D qui phosphorylent Rb d'une part et qui séquestrent les Cip/Kip d'une autre part afin de désinhiber les complexes cdk2-cycline E (voir figure 3). De plus, une fois activé, cdk2-cycline E phosphoryle p27^{Kip1} qui est ensuite dégradé, ce qui contribue d'avantage à l'irréversibilité du point de restriction (6).

L'autre classe de CKIs, les protéines INK4, comprend 4 membres : p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}. Ils ont tous la particularité de former des complexes binaires avec cdk4/6 de façon à libérer les CKI de la famille Cip/Kip normalement associé aux complexes cdk4/6-cycline D. Ils assurent donc l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant indirectement cdk2-cycline E en augmentant les niveaux de Cip/Kip libre dans les cellules (voir figure 4). Malgré tout, Rb demeure l'ultime régulateur de la transition G1/S puisque la relâche des CKIs est insuffisante pour inhiber les complexes cdk2-cycline E dans les cellules Rb négatives (7). L'importance de p16^{INK4a} dans l'inhibition du cycle cellulaire, est constatée dans plusieurs types de cancers où il est souvent supprimé comparativement aux autres gènes INK4. Il donc été proposé que p16^{INK4a} avait un rôle spécial dans la défense anti-tumorale (6, 8).

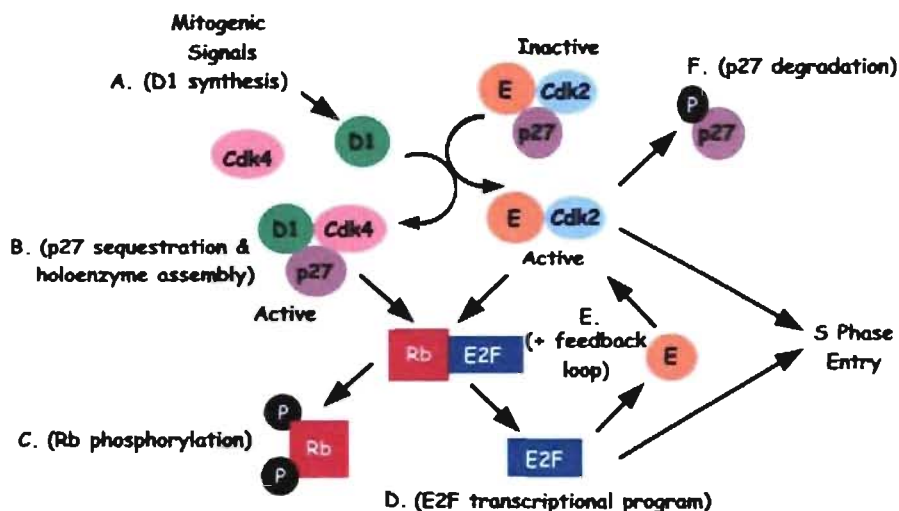


Figure 2. Mécanisme d'action de la progression en phase S.

Tiré de (9)

1.3. ARF; la connexion entre p53 et Rb

Le gène *INK4a* code aussi pour un deuxième suppresseur de tumeur, $p14^{\text{ARF}}$ et $p19^{\text{ARF}}$ chez la souris. $p14^{\text{ARF}}$ est produit à partir d'un exon alternatif en amont de la séquence codante de $p16^{\text{INK4a}}$ qui, lorsque épissé avec les 2 autres exons formant le gène *INK4a*, se retrouve dans un cadre de lecture différent de celui de $p16^{\text{INK4a}}$, générant ainsi deux protéines distinctes n'ayant aucune similarité (8). Lorsque surexprimé, $p14^{\text{ARF}}$ induit l'arrêt de croissance tant en phase G_1 qu'en phase G_2 du cycle cellulaire. Les souris dont le gène de ARF a été inactivé sont prédisposées aux tumeurs et les cellules provenant de ces souris deviennent immortelles lorsqu'elles sont mises en culture. Habituellement, les MEF primaires en culture sont résistants à la transformation par l'oncogène Ras. Cependant, les MEFs de souris nulles pour ARF peuvent être transformés par ce dernier (10). Ainsi, il a été proposé que ARF fonctionnait dans la même voie biochimique que p53 puisque les MEFs provenant des souris p53 nuls sont immortels et sont aussi transformés par Ras.

p53 est un facteur de transcription homotétramérique qui peut induire l'arrêt de croissance ou l'apoptose en activant, entre autre, la transcription de p21^{Cip1} et Bax, respectivement. Il a ensuite été démontré que ARF agissait en amont de p53 puisque l'introduction de ARF ou dans les cellules p53 nulles ne peuvent induire un arrêt de croissance (8). Ainsi, ARF antagonise l'effet de Mdm2, le principal régulateur négatif de p53, de façon à le stabiliser. La régulation de p53 est extrêmement délicate et complexe puisqu'il se régule lui-même en inhibant l'expression de ARF et en stimulant celle de Mdm2 afin d'achever la réponse engendrée par son activation. Ainsi, ARF, en stabilisant p53 qui peut ensuite augmenter l'expression des Cip/Kip, permet de freiner le cycle cellulaire en inhibant indirectement l'activité des cdk's (6, 8, 9).

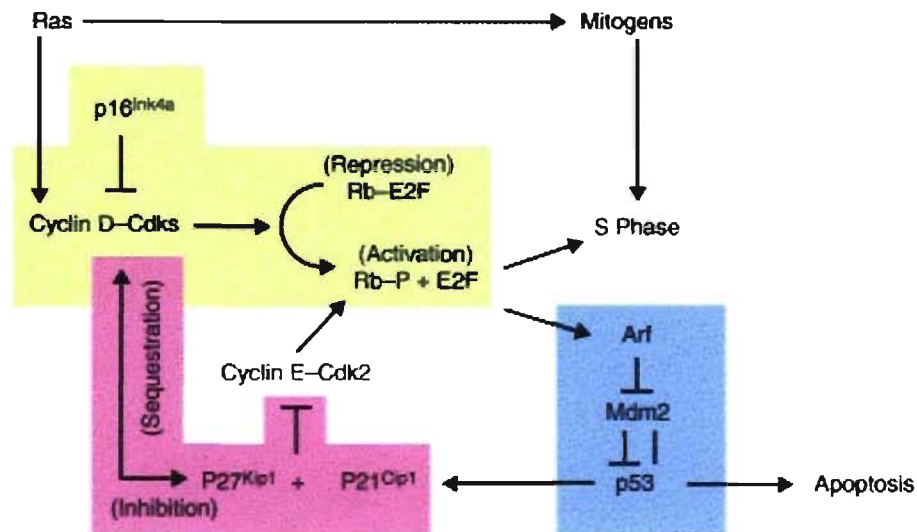


Figure 3. Synergie des membres de la famille INK4 et Cip/Kip dans la régulation de la transition en phase S.

Adapté de (8)

CHAPITRE 2. La suppression tumorale

Toutes les formes de vie sur terre sont exposées à une multitude d'agents pouvant endommager leur ADN et éventuellement causer des mutations dans le génome des cellules. Ces agents, tels les rayons UV du soleil, peuvent provenir d'une source exogène ou être produit par les cellules elles-mêmes lors du métabolisme, source abondante de radicaux libres. Ces mutations peuvent être classées en deux grandes catégories : celles qui confèrent un gain de fonction promouvant la prolifération et celles inactivant les gènes des points de restrictions qui s'assurent habituellement que les cellules n'arborent aucunes de ces mutations. L'accumulation de mutations mène ultimement à une prolifération incontrôlée des cellules et est un pré-requis de la tumorigenèse. Ainsi, plusieurs mécanismes de défense intrinsèques sont apparus au cours de l'évolution afin de détecter de telles mutations et empêcher l'expansion clonale des cellules qui ne peuvent plus réparer ces dommages (11, 12).

2.1. Les mécanismes de suppression tumorale

La majorité des supprimeurs tumoraux peuvent être classée en deux catégories générales : les "caretakers" et les "gatekeepers". Les "caretakers" préviennent la formation de cancers en protégeant le génome des mutations génétiques tandis que les "gatekeepers" agissent directement sur les cellules menaçant de devenir cancéreuses. Les gènes qui aident à maintenir l'intégrité du génome préviennent aussi l'apparition du phénotype et de maladies associées au vieillissement (13). Ainsi, les "caretakers" sont perçus comme des gènes pro-longévité. De leur côté, les "gatekeepers" promeuvent la longévité en empêchant le développement du cancer. Cependant, ils peuvent avoir des effets cumulatifs néfastes et ainsi limiter la longévité en contribuant au vieillissement et à ses maladies associés. Ainsi, le concept qu'un gène peut être protecteur pour l'organisme tôt durant la vie (en empêchant la formation de cancer), mais qu'il devient nuisible à un stade avancé de la vie (en compromettant la fonction des tissus) est appelé pléiotropie antagoniste (14). Deux

mécanismes de suppression tumorale, qui contribuent à ce phénomène, sont utilisés par les cellules pour empêcher l'apparition de cancer : l'apoptose et la sénescence cellulaire.

2.2. L'apoptose

L'apoptose est le mécanisme par lequel les cellules commettent le suicide cellulaire. Ce mécanisme est important, entre autre, pour le développement embryonnaire et pour l'homéostasie des organes. En effet, l'apoptose peut être induit suite à une différenciation, souvent par des signaux intrinsèques, et il sert à éliminer les cellules endommagées dans les organes, suite à des signaux extrinsèques. Or, lorsque le mécanisme d'apoptose est défectueux le taux de cancer augmente drastiquement (15). En effet, les souris génétiquement modifiées qui ont une réponse défectueuse à l'apoptose meurent prématurément de cancer. Conformément au rôle vital de l'apoptose dans la suppression tumorale, ce mécanisme est contrôlé positivement par p53 (11). Finalement, il a été proposé que tant la suractivation ou l'activation inappropriée de l'apoptose cause ou contribue au vieillissement (15).

2.3. La sénescence cellulaire

La sénescence a tout d'abord été décrite comme la capacité limite des fibroblastes normaux humains à proliférer en culture (16). La sénescence est caractérisée par un arrêt de croissance stable et permanent où les cellules demeurent métaboliquement actives. Les cellules sénescences présentent une morphologie ronde et plate accompagnée de nombreuses vacuoles et un noyau anormalement grossit. Mis à part les changements morphologiques, les cellules sénescences peuvent être distinguées par différents marqueurs comme l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal), les foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) et des signaux de dommages à l'ADN persistants (17-20). Le phénotype de sénescence est très stable et contrairement à la quiescence (arrêt de croissance réversible), les cellules sénescences ne répondent pas aux

signaux mitogéniques comme le sérum et les facteurs de croissance. Suite à la découverte que l'oncogène *ras* pouvait activer un programme de sénescence (21), il a été proposé que la sénescence agissait en tant que mécanisme de suppression tumorale. Par la suite, il a été démontré que de multiples oncogènes, incluant STAT5, E2F1, Mos, Cdc6, Raf et MEK/MAPK, pouvaient induire la sénescence en culture (20, 22-25). Mais ce n'est que récemment que le rôle anti-tumoral de la sénescence a été confirmé *in vivo* alors qu'une série d'études a démontré que la sénescence empêchait la formation de multiples tumeurs (26-29).

2.3.1. La sénescence répllicative et prématurée

La sénescence initialement observée par Hayflick fût appelée sénescence répllicative puisque les cellules devaient se diviser à plusieurs reprises avant d'entrer dans cet état post-mitotique stable. Il a ensuite été démontré que les cellules en division atteignaient cette soit disant limite de Hayflick essentiellement à cause de l'érosion des télomères (30). Les télomères sont les séquences répétitives d'ADN couvertes de protéines spécifiques à l'extrémité des chromosomes qui préviennent leur fusion par les processus de réparation de l'ADN. Ils contribuent ainsi à maintenir l'intégrité du génome. Ces télomères raccourcissent d'environ 50 à 200 paires de bases après chaque division cellulaire puisque la machinerie répllicative ne peut répliquer fidèlement l'extrémité 3' des chromosomes. Lorsque la longueur des télomères est suffisamment courte pour détruire la structure de ceux-ci, le programme de sénescence est activé. Les cellules qui n'arrivent pas à entrer en sénescence et qui prolifèrent malgré des télomères dysfonctionnels développent des aberrations chromosomiques et peuvent ultimement causer le cancer. De plus, l'expression de la télomérase, une reverse transcriptase permettant l'élongation des télomères, augmente la limite répllicative des cellules (30). Par conséquent, il n'est pas surprenant de constater que la plupart des cellules cancéreuses exprimeront ultimement cette enzyme.

Le phénotype de sénescence peut aussi être induit, indépendamment de l'état des télomères, par une multitude de stress dont les dommages à l'ADN, le stress oncogénique, le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique, l'hypoxie et des conditions de cultures sub-optimales (31, 32). Il est maintenant reconnu que tous les stimuli induisant la sénescence mènent à des dommages à l'ADN et que les voies de dommages à l'ADN est primordial pour initier le programme de sénescence (19, 20, 23, 24). En effet, même la sénescence répllicative est activée par ses voies de signalisation puisque les télomères trop court sont perçus par les cellules comme des cassures à l'ADN (19). Les cellules sénescents lorsque ces dommages sont irréparables ou qu'ils sont trop accablants pour la machinerie de réparation de l'ADN. Mais comment les oncogènes peuvent-ils induire de tels dommages? Il a été proposé que les signaux mitogéniques supra-physiologiques induis par les oncogènes causent un stress réplicatif (23, 24). Ce stress force l'arrêt des fourches de réplication qui peuvent s'effondrer et générer des cassures double brin dans l'ADN. De plus, il a été démontré que les oncogènes stimulent la production d'espèces réactives oxygénées (ROS), connus pour endommager l'ADN, et que leurs productions sont nécessaires pour l'induction de la sénescence (33). Quelque soit l'origine des signaux induisant la sénescence, ils semblent tous converger vers les voies de suppression tumorales qui établissent et maintiennent l'état de sénescence. Ces voies de signalisation sont gouvernées par les suppresseurs tumoraux p53 et Rb (34).

2.3.2. La voie de p53

p53 est un facteur de transcription pouvant agir comme un activateur ou un répresseur de l'expression génique (voir section 1.3). Cependant il agit principalement dans l'induction de l'arrêt de croissance en activant la transcription de p21. L'importance de p53 dans le processus de sénescence provient d'étude qui démontre que l'inactivation de p53 empêche les cellules d'entrer en sénescence répllicative (35) et en sénescence prématurée (36). En effet, p53 est un médiateur crucial des réponses aux dommages à l'ADN et il a été

démontré que des télomères dysfonctionnels activent ces voies de signalisation (19) tout comme les oncogènes (20). Cependant, certaines études ont démontré que l'inactivation seule de p53 n'est pas suffisante pour empêcher l'induction de sénescence (20, 37) tandis que d'autres ont démontré le contraire (38). En effet l'inactivation du gène de p21 est suffisante pour contourner la sénescence réplivative (39). Malgré tout, ces études contradictoires ont pu être expliquées par les différences de types cellulaires utilisés. En effet, il semble que chaque type cellulaire répond différemment aux signaux induisant la sénescence (38, 40) et que ces différences soient aussi spécifiques à l'organisme (32).

2.3.4. La voie de Rb

L'induction de sénescence observée dans ces autres types cellulaires semble plutôt dépendre de la voie de Rb via l'induction de p16^{INK4a}. En effet, il a été démontré que p16 était induit par une variété de stimuli, incluant les oncogènes et des conditions de cultures inappropriées (8) et que ses niveaux augmentaient lors de la sénescence réplivative (41, 42). De plus, il est requis pour la sénescence induite par ras (43). Alors que la voie de p53 semble agir comme instigateur de la sénescence, la voie Rb, elle, semble être l'effecteur. L'induction de sénescence est accompagnée d'une réorganisation de la chromatine qui requiert la protéine Rb (18). Les cellules sénescents développent de denses foci d'hétérochromatine aux promoteurs de gènes ciblés par les facteurs de transcription E2F, l'empêchant ainsi de promouvoir la progression des cellules dans le cycle cellulaire (18). Ainsi, lorsque la voie de Rb est engagée l'arrêt de croissance induit par la sénescence ne peut être renversé par l'inactivation subséquente de p53, de p16 ou Rb (38), ce qui pourrait expliquer la stabilité remarquable du phénotype de sénescence. La figure 4 résume brièvement l'action de chacune des voies dans la sénescence.

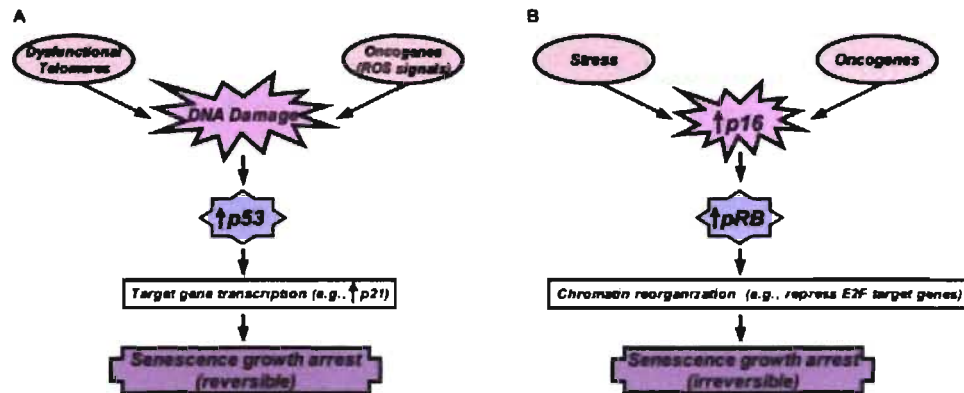


Figure 4. Rôles des voies de p53 et p16/Rb dans l'induction de la sénescence.

A) La voie de p53 est activée par les dommages à l'ADN, les télomères dysfonctionnels et le stress génotoxique produit par les oncogènes et se traduit par l'induction de p21 pour induire l'arrêt de croissance. Ce type de sénescence peut être réversible suite à l'inactivation subséquente de p53. B) La voie de pRb est activée par les oncogènes et tous autres types de stress qui augmentent les niveaux d'expression de p16. Celui-ci active indirectement Rb qui établira les foci d'hétérochromatines aux loci des gènes régulés par E2F. Une fois établie, la sénescence induite par Rb est irréversible et ne peut être renversée par l'inactivation subséquente de p53 et/ou Rb. Tiré de (44).

2.3.5. La sénescence et le vieillissement

Les premières évidences reliant la sénescence et le vieillissement proviennent d'études ayant clairement démontré que l'organisme accumule plus de cellules sénescents avec l'âge tant chez l'homme (17, 45) que chez les primates (46, 47). Il a ensuite été proposé que ces cellules sénescents contribuent à la perte de structure et de fonctions des organes observée lors du vieillissement (14, 48). Les cellules sénescents surexpriment plusieurs métalloprotéinases de la matrice, des cytokines inflammatoires et certains facteurs de croissances qui peuvent détruire le microenvironnement des organes. La sénescence a aussi été reliée à différentes maladies associées au vieillissement tels que l'athérosclérose et le cancer. En effet, la présence d'une trop grande proportion de cellules sénescents dans un tissu semble promouvoir l'expansion de cellules pré-néoplasiques et ainsi facilité la progression de cancer tardif (49).

CHAPITRE 3. Les facteurs de transcription forkheads

Le forkhead, caractérise la famille des facteurs de transcription qui porte son nom dont le premier gène, contenant ce domaine de liaison à l'ADN très conservé, a été découvert chez la *Drosophila* (50-52). La mutation de ce gène causait des transformations homéotiques de certaines structures intestinales alors que les structures postérieures et antérieures étaient remplacées par des structures formant la tête disposées en forme de pics, d'où le nom forkhead (50). Depuis la reconnaissance de cette famille de facteur de transcription, plus de 100 gènes forkhead ont été identifiés dans différents organismes s'étendant des levures à l'humain quoique aucun n'ait été identifié chez les plantes. De plus, le nombre de gènes forkhead semble avoir augmenté durant l'évolution puisque 4 facteurs de transcription ont été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* alors qu'on en dénombre pas moins de 43 chez l'homme et la souris. De plus, la position chromosomique de ces gènes chez l'humain et la souris n'est pas aléatoire puisqu'ils présentent la même position sub-télomérique et centromérique comparativement à d'autres familles de gènes. En somme, huit amas de gènes forkheads ont été identifiés chez l'humain en plus d'une vingtaine de gènes dispersés à travers le génome (tableau I) (53).

En l'an 2000, une nomenclature générale a été mise sur pied en tenant compte des origines phylogénétiques de tous les gènes forkheads (54), de façon à uniformiser les multiples noms associés à ces gènes tels que *fkf* (forkhead), FREAC (forkhead-related activator), HFH (hepatocyte nuclear factor 3/forkhead homologue), FKHR (forkhead in rhabdomyosarcoma) et FKHL (forkhead homolog-like). Dans cette nomenclature, chaque membre d'une famille est désigné i.e. Foxn3, où Fox reflète la présence d'un forkhead box, tandis que la lettre qui suit désigne la sous-famille à laquelle il appartient, présentement de A à Q, alors que le chiffre distingue les différents membres de la sous-famille. Les différentes espèces sont distinguées par l'utilisation de lettres majuscules pour l'humain

Tableau I. Distribution chromosomique des gènes forkheads humains.

Amas de gènes Forkheads		Forkheads seuls	
Nom	Localisation	Nom	Localisation
FOXD2	1p32-34	FOXN2	2p16-22
FOXD3	1p31-32	FOXP1	3p13
FOXE3	1p32	FOXL2	3q23
FOXF2	6p25	FOXD1	5q12-q13
FOXC1	6p25	FOXI1	5q35
FOXQ1	6p25	FOXK1***	7p22.1
FOXO3a	6q21	FOXP2	7q31
FOXO2	6q21	FOXH1	8q24
FOXD4	9q21	FOXN5**	11q23.3
FOXE1	9q22	FOXN4	12q24
FOXJ2	12p13	FOXO1a	13q14
FOXM1	12p13	FOXK1b	14
FOXA1	14q12-13	FOXN3	14q32.11
FOXG1a	14q13	FOXB1	15q21-26
FOXG1b	14q13	FOXO3b	17p11
FOXF1	16q24	FOXN1	17q11-q12
FOXL1	16q24	FOXA3	19q13.2-q13.4
FOXC2	16q24	FOXA2	20p11
FOXJ1	17q22-25	FKHL18	20q11.1-q11.2
FOXK2a	17q25	FOXE2	22q13-qter
FOXK2c	17q25	FOXO4	Xq13
FOXP3	Xp11.23		
FOXN6*	Xp11.21		

*(55), **(56), ***(57)

(i.e. FOXN3), d'un F majuscule pour la souris (i.e. Foxn3) et d'un F majuscule et une majuscule pour la lettre de la sous-famille pour toutes autres espèces (i.e. FoxN3). Les sous-familles sont basées sur le niveau de conservation et les similarités structurales du domaine forkhead. L'importance des facteurs de transcription forkheads a tout d'abord été reconnue dans la biologie du développement (58), mais depuis plusieurs années de multiples rôles leurs ont été attribués dans divers domaines tels que le métabolisme, la survie cellulaire, l'immunorégulation et le contrôle du cycle cellulaire.

3.1 Domaines protéiques fonctionnels des forkheads

3.1.1 Domaine de liaison à l'ADN de type Forkhead

Tous les facteurs de transcription forkheads possèdent un domaine de liaison à l'ADN extrêmement conservé, nommé ainsi d'après le gène forkhead de la *Drosophile*. La structure tridimensionnelle du domaine forkhead a été caractérisée par cristallographie aux rayons X et par spectroscopie RMN (figure 4). D'après ces études, ce domaine a aussi été nommé "winged-helix" puisqu'il ressemblait étrangement à la forme d'un papillon en plus d'avoir une composition comparable au motif hélice-tour-hélice (59). Par contre, le motif "winged-helix" n'est pas exclusif aux facteurs de transcription forkheads puisque d'autres protéines évolutionnairement non-relées contenant ce motif ont été identifiées (60). Le domaine forkhead classique est constitué d'environ 100 acides aminés formant trois hélices- α et trois feuillets- β repliés en motif hélice-tour-hélice flanqué de deux boucles disposées dans l'ordre suivant : $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ -B1- $\beta 3$ -B2 (figure 5). Certaines exceptions ont été documentées entre autres, des hélices- α additionnelles (61, 62) et des feuillets- β ou des boucles manquantes (63, 64). Une très grande similarité de séquence est observée dans les hélices- α et les feuillets- β , particulièrement dans la troisième hélice, alors qu'un faible niveau d'identité est présent dans les boucles et entre la deuxième et troisième hélice dans lesquelles on retrouve la plupart des variations structurales.

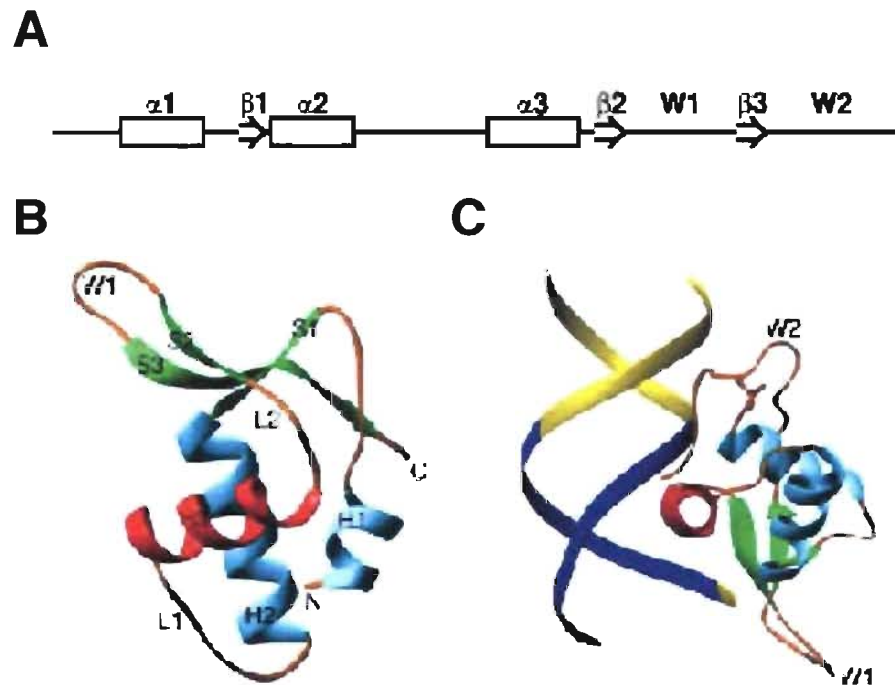


Figure 5. Schéma du domaine forkhead.

A) Structure secondaire du domaine forkhead montrant les hélices alpha (α), les feuillets bêta (β) et les boucles (W). B) Structure tridimensionnelle de ce même domaine montrant les boucles (W), les hélices (H) et les feuillets β (S). C) Structure tridimensionnelle montrant l'interaction entre l'ADN et l'hélice de reconnaissance ($\alpha 3$). L'hélice de reconnaissance est en rouge et fait contact dans le sillon majeur de l'ADN. La boucle 2 (W2) peut aussi influencer l'interaction ADN-protéine. Adaptées de (60, 65).

Bien que plusieurs contacts s'effectuent avec la charnière sucre-phosphate, la liaison du forkhead à sa séquence d'ADN spécifique s'effectue principalement par la troisième hélice- α , communément appelé l'hélice de reconnaissance, qui lie directement le sillon majeur de l'ADN (59, 66). Considérant le haut degré de conservation de séquence et structural, spécialement dans l'hélice de reconnaissance, il est généralement accepté que tous les forkheads lient l'ADN de façon similaire. Cependant, puisque la plupart des résidus faisant contact avec l'ADN sont très conservés, d'autres caractéristiques doivent nécessairement conférer une spécificité pour la séquence reconnue. Il a été démontré que

les acides aminés positionnés en N-terminale de l'hélice de reconnaissance et dans la deuxième boucle en sont principalement responsable (61, 67, 68). En effet, la liaison de la deuxième boucle au sillon mineur de l'ADN peut influencer la stabilité et la spécificité de l'interaction lorsqu'elle est de forte affinité (69). Cependant, bien que la première boucle fasse contact avec l'ADN, elle ne contribue pas significativement à l'interaction protéine-ADN (60, 70). Contrairement à certaines familles de facteurs de transcription, les forkheads lient habituellement leur séquence d'ADN cible sous forme de monomères. Cependant, il a récemment été démontré que la sous-famille FoxP, incluant FoxP1-2 et 4, nécessite la dimérisation pour lier l'ADN (71), celle-ci étant possible grâce à leur domaine zipper de leucine (62).

L'hélice de reconnaissance lie différentes séquences d'ADN possédant toutes la séquence consensus A/C-A-A-C/T-A, étant requise, mais pas suffisante pour la liaison (64, 67, 68). Des séquences flanquantes additionnelles sont essentielles pour assurer la spécificité de liaison. Généralement, les membres d'une même sous-famille ont la capacité de lier une même séquence d'ADN. À titre d'exemple, les membres de la sous-famille FoxO peuvent tous reconnaître et lier la séquence consensus T/C-G/A-A-A-A-C-A-A (72). À l'exception du domaine forkhead qui est très conservé, très peu de similarité existe entre les différentes régions des autres forkheads. Malgré tout, de nombreux domaines protéiques et motifs ont été identifiés dans plusieurs forkheads, habituellement à l'intérieur même d'une sous-famille. Ces caractéristiques communes ont tout d'abord été découvertes dans une même sous-famille, généralement la sous-classe FoxO, pour ensuite être progressivement découvertes dans d'autres sous-familles.

3.1.2. Les Domaines de transactivation

Les facteurs de transcription forkheads diffèrent dans leurs propriétés de régulation transcriptionnelle puisqu'ils peuvent agir en tant qu'activateurs ou répresseurs de l'expression génique. Depuis plusieurs années, les données recueillies suggèrent que plusieurs forkheads peuvent agir d'une façon comme de l'autre dépendamment du

recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs. Le tableau 2 énumère les propriétés transcriptionnelles de la plupart des forkheads connus. En général, les membres d'une même sous-famille partagent les mêmes fonctions activatrices ou répressives bien qu'il y ait plusieurs exceptions à cette règle. Les inconsistances retrouvées dans les propriétés transcriptionnelles entre les forkheads sont reflétées par l'absence de domaines d'activation, tels que les courtes régions basiques ou acides, ou de répression, tel que les régions enrichies en acides aminés spécifiques de type polyglutamique, conventionnels conservés. De plus, même si certains de ces domaines sont présents dans quelques facteurs, ils n'ont pas l'activité catalytique attendue. En effet, un domaine acide, habituellement caractérisé comme une région de transactivation, a été identifié chez Foxd2 et Foxd3 (73) alors que ceux-ci fonctionnent généralement en tant que répresseurs transcriptionnels. Malgré tout, d'autres répresseurs, particulièrement Foxp1 et Foxp2, partagent un domaine répresseur similaire, contenant un doigt de zinc, en N-terminal de leur domaine forkhead (74). Somme toute, il est difficile de prédire les propriétés transcriptionnelles des différents forkheads en se basant uniquement sur les domaines retrouvés dans les différentes protéines.

3.1.3. Signaux de localisation nucléaire (SLN)

Pour qu'un facteur de transcription puisse réguler l'expression génique, il doit nécessairement être localisé au noyau. Les SLNs ont été identifiés dans la plupart des membres de chaque sous-famille et se retrouvent principalement localisés aux alentours du domaine forkhead. Les membres de la sous-famille FoxO partagent un SLN double bien caractérisé qui est situé en position carboxy-terminal du domaine de liaison à l'ADN (75, 76). Dans le cas de FoxA2, FOXC1, FOXF2 et FOXJ2, la localisation nucléaire dépend de deux courts segments d'acides aminés situés en N-terminal ($\alpha 1$) et en C-terminal (B2) du domaine Forkhead (77-80). Considérant le haut niveau de similarité de séquence du domaine forkhead, il serait attrayant de spéculer que tous les SLNs sont arrangés de façon similaire dans les autres sous-familles, bien que ce ne soit pas toujours le cas (voir section 3.7). L'importance de ces courts motifs est reflétée par leurs fréquentes régulations post-

traductionnelle. En effet, un motif de phosphorylation de la kinase PKB/Akt situé dans le SLN a un impact majeur sur ses propriétés fonctionnelles, agissant de concert avec d'autres modifications post-traductionnelles pour exporter les FoxOs hors du noyau (section 3.2.1).

3.2. Les modifications post-traductionnelles

À ce jour, trois types de modifications sont connues pour réguler les forkheads : la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination dont la plupart ont été recensées dans la sous-famille FoxO.

3.2.1. Les motifs de phosphorylation

La phosphorylation est sans contredit la modification post-traductionnelle la plus étudiée. Les premières évidences que les forkheads étaient phosphorylés provenaient d'études génétiques dans le ver *C. elegans* montrant que la famille FOXO était des cibles clés de la voie de signalisation PI3K-Akt (81, 82). Par la suite, des études biochimiques dans les cellules de mammifères ont démontré que Akt et SGK phosphoryle directement les facteurs de transcription FOXOs sur trois sites en réponse à l'insuline et l'IGF-1 (Thr32, Ser253 et Ser315 dans la séquence de FoxO3) (83, 84). Ces phosphorylations entraînent la translocation des facteurs du noyau vers le cytoplasme (83, 85). Un mécanisme similaire a ensuite été décrit pour Foxa2 (86). Bien que l'on retrouve le consensus de phosphorylation de Akt, R-X-R-X-X-S/T dans d'autres facteurs FOXs (87), Foxa2 est le seul facteur n'appartenant pas à la sous-famille FoxO étant régulé par les voies de signalisation de l'insuline. L'insuline et les facteurs de croissance entraînent aussi la phosphorylation d'autres sites sur les FoxOs, via la caséine kinase 1 (88) et la DYRK1 (89), qui participent toutes à la régulation de la localisation cellulaire des facteurs. Alors que l'effet des MAPK sur les FoxOs est inhibiteur, ils agissent plutôt comme activateurs de FoxM1. En effet, FoxM1 se retrouve au cytoplasme dans des conditions normales et transite vers le noyau en présence de signaux mitogéniques (90). Ainsi, une même voie de signalisation semble avoir

Tableau II. Propriétés transcriptionnelles des facteurs de transcription Forkheads.

Forkheads	Activateur (+) ou Répresseur (-)
FoxA	+
FoxC1	+
FoxC2	+/-
FoxD1	+
FoxD2	+/-
FoxD3	-
FoxE1	-
FoxF1-FoxF2	+
FoxG1	-
FoxH1	+
FoxI1	+
FoxJ1-FoxJ2	+
FoxK1	-
FoxK2	+
FoxL2	-
FoxM1	+
FoxN1	+
FoxN3	-
FoxN4*	+
FoxO1-FoxO6	+/-
FoxP1-FoxP4	-
FoxQ1	-

Adapté de (65). *(91)

des effets antagonistes en empruntant cependant un même mécanisme d'action, soit la relocalisation cellulaire.

3.2.2. Les motifs d'acétylation

Étant donné l'importance des forkheads dans une multitude de processus biologique, il n'est pas surprenant qu'ils soient acétylés. Or, l'acétylation directe des FoxOs par CBP/p300 ou sa déacétylation par SIRT1 peuvent influencer la régulation de certains gènes cibles (92, 93). Il a été proposé que l'acétylation de résidus lysines chargés positivement dans le domaine forkhead de FoxO1 diminuait sa capacité de lier l'ADN et réduisait ainsi son activité transcriptionnelle (94). De plus, ils ont aussi démontré que l'acétylation initiale sensibilisait FoxO1 à la phosphorylation par PKB, contribuant davantage à son inactivation (94). Cependant, il a aussi été démontré que la déacétylation de Foxo3a par SIRT1 réprimait son activité transcriptionnelle (92). Bien que contradictoire, la diversité des effets que peut avoir l'acétylation sur l'activité des forkheads peut être spécifique à chaque contexte et type cellulaire. Qu'à cela ne tienne, la présence des sites consensus d'acétylation dans plusieurs forkheads souligne l'importance de cette modification dans la régulation de ces facteurs de transcription et suggère l'existence d'une voie commune de régulation.

3.2.3. L'ubiquitination

Alors que les forkheads sont majoritairement régulés par phosphorylation (voir section 3.2.1), les cellules utilisent un autre moyen de régulation post-traductionnelle, l'ubiquitination. Dans la majorité des cas, l'activité des forkheads sera régulée par la polyubiquitination afin de permettre la dégradation de la molécule par le protéasome (95, 96). La dégradation des FOXOs est un phénomène important puisqu'elle précède souvent la transformation cellulaire ce qui suggère que ce mécanisme de régulation est une étape critique dans la tumorigenèse (97, 98). L'ubiquitination peut aussi activer les forkheads. Il a

été démontré que la monoubiquitination pouvait augmenter l'activité des forkheads en régulant leur translocation vers le noyau (99).

3.3. Domaines et motifs d'interaction protéiques

Les facteurs de transcription forkheads possèdent plusieurs domaines et motifs d'interaction protéique leur permettant de réguler une multitude de processus biologique. Après la caractérisation du domaine de liaison à l'ADN forkhead, le domaine FHA (forkhead-associated domain) a été identifié (100). Le domaine FHA est retrouvé dans une multitude de protéines et permet les interactions protéines-protéines en reconnaissant et liant les protéines phosphorylées spécifiquement sur des résidus thréonine. Il est principalement impliqué dans le contrôle des points de restrictions de la voie des dommages à l'ADN et dans le cycle cellulaire (101, 102). L'importance du rôle du domaine FHA dans la régulation du cycle cellulaire est démontrée dans le forkhead, Fkh2. Il permet la régulation temporelle de l'expression d'un groupe de gènes, le cluster Clb2, chez la levure *S. cerevisiae* (103, 104).

Les forkheads sont aussi impliqués dans les voies de signalisation de la superfamille du TGF- β . FoxH1 a été identifié comme un cofacteur pour les complexes SMADs en interagissant directement avec ceux-ci via son domaine SID (105, 106). Récemment, il a été démontré que le domaine de liaison à l'ADN des FoxOs interagissait directement avec le domaine MH1 de Smad3-4 au promoteur du gène p21^{Cip1} afin d'activer sa transcription (107). Puisque aucun motifs d'interaction aux SMADs ont été identifiés dans les forkheads autre que FoxH1, ceci suggère qu'il existe d'autres domaines d'interaction aux smads.

Les forkheads sont aussi connus pour interagir avec de multiples familles de récepteurs nucléaires. Les membres de la sous-famille FoxO, en particulier, s'associent avec plusieurs récepteurs nucléaires tels que le récepteur de l'androgène (108), le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur de l'acide rétinoïque (109). Ces interactions sont

soutenues par un court motif, contenant la séquence LXXLL appelé la boîte NR (nuclear receptor), présent dans les co-facteurs reconnaissant les récepteurs nucléaires activés par leur ligand (110). Ce motif est aussi présent dans plusieurs autres forkheads dont Foxm1 (111), Foxk1 et tous les membres de la sous-famille Foxp (65).

Puisque les facteurs forkheads reconnaissent et lient généralement des séquences d'ADN similaires, l'interaction avec d'autres familles de facteurs de transcription pourrait leur conférer une certaine spécificité pour la régulation de gènes particuliers. De ce fait, il a été démontré que les forkheads peuvent interagir directement, via leur domaine de liaison à l'ADN, avec les facteurs de transcription à homéodomains. FOXC1, FoxD3 et Foxa2 peuvent interagir avec plusieurs protéines à homéodomains tels que PITX2, Oct-4, Pdx-1, HOXA10 et engrailed (112-115).

3.4. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle

Malgré le nombre grandissant de gènes forkheads et l'accroissement des connaissances quant à leurs fonctions tant *in vitro* qu'*in vivo*, pratiquement aucuns détails de leurs mécanismes de régulation des gènes ne sont connus. En revanche, l'interaction directe entre les composants de la machinerie transcriptionnelle de base, TBP et TFIIB, a été décrite pour FOXF2 et la sous-famille FoxO. De plus, il a été proposé que les FoxOs fonctionnent en recrutant CBP/p300 pour permettre l'acétylation des histones, ce qui en revanche, provoque la décompaction de la structure chromatinienne donnant ainsi accès aux facteurs généraux de la transcription aux différents promoteurs des gènes cibles (116).

Pour sa part, FoxA1 détermine la position des nucléosomes des régions "enhancers" dans les cellules transcriptionnellement compétentes (117). FoxA1 peut lier les histones nucléosomales de façon à remplacer les histones de liaison, H1 et H5, ce qui permet le relâchement de l'état de compaction de la chromatine. De plus, la liaison de FoxA1 à l'ADN provoque une courbure dans la double hélice de façon à ouvrir le sillon mineur (59,

68). En somme, il en résulte une conformation ouverte de la chromatine permettant aux autres facteurs de transcription d'activer l'expression des gènes cibles. Dans le cas du répresseur transcriptionnel Foxk1, il interagit avec la protéine d'échafaudage Sin3b (118). Cette protéine fait partie d'un complexe de co-répresseurs comprenant des histones déacétylases (HDAC) et/ou des facteurs de remodelage de la chromatine. Puisque que ce complexe est dépourvu de domaine de liaison à l'ADN, leur recrutement par Foxk1 permettrait de refermer la chromatine et réprimer spécifiquement les gènes ciblés par celui-ci. Il n'est toujours pas connu si d'autres répresseurs transcriptionnels tels que Foxd3 et Foxp1 utilisent un mécanisme similaire.

3.5. Fonctions des forkheads

Étant donné le très grand nombre de forkheads, il n'est pas surprenant de constater qu'ils soient impliqués dans une multitude de processus biologique. Cependant, afin d'alléger le présent manuscrit, l'emphase sera portée sur la régulation du cycle cellulaire et la survie cellulaire. Brièvement, les rôles des forkheads dans le métabolisme et le système immunitaire seront abordés, mais leurs implications dans le développement embryonnaire seront omis puisque pratiquement chaque forkheads étudiés ont un rôle dans cet aspect de la biologie et donc, les lecteurs sont référés à d'autres ouvrages afin d'approfondir leur connaissance dans cette sphère de la biologie (58, 65, 119-122).

Jusqu'à présent, la régulation du métabolisme est confinée aux sous-familles FoxA, FoxC et FoxO. Chacun des trois membres de la sous-familles FoxA est impliqué dans le métabolisme du glucose alors que FoxA2 a aussi été relié au métabolisme des acides gras (123), tout comme FOXC2 (124). Pour leur part, les membres de la sous-famille FoxO sont surtout impliqués dans le métabolisme du foie, des muscles et du pancréas en contrôlant les effets de l'insuline sur la gluconéogénèse (72, 125).

Plusieurs forkheads sont exprimés dans le système immunitaire où ils contrôlent le développement et les fonctions des différents types cellulaires. Foxp3 est le plus étudié de tous et contrôle principalement le développement et les fonctions des lymphocytes T

régulateurs CD4⁺CD25⁺, qui sont directement reliés à la tolérance immunologique et à l'auto-immunité (126-128). Foxj1 et Foxo3a sont impliqués dans la régulation de la tolérance des lymphocytes T CD4⁺ alors que Foxp1, Foxq1 et Foxd2 jouent un rôle dans la différenciation des macrophages, les fonctions effectrices des cellules tueuses naturelles (NK) et dans l'activation des lymphocytes T, respectivement (129, 130). Notons que Foxn1 joue un rôle dans le développement et la différenciation des cellules épithéliales du thymus qui, en retour, sont essentielles au développement et à la sélection des lymphocytes T (129, 130).

3.5.1. Survie cellulaire

Les premières indications que les forkheads étaient impliqués dans la régulation de la survie cellulaire proviennent d'études chez *Caenorhabditis elegans* où les mutations du récepteur de l'insuline (131) et de la PI3K (132) augmentent la longévité d'au moins trois fois. Cependant, cette augmentation de longévité est perdue lorsque le forkhead DAF-16 est muté (81, 82). Ainsi, DAF-16 semblait directement impliqué dans la régulation de la longévité, et du fait même de la survie cellulaire, sous le contrôle des voies de signalisation de l'insuline dépendante de la kinase Akt (133). Ces voies de signalisations sont très conservées dans les différentes espèces et chez les mammifères les orthologues de DAF-16; FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6 sont tous régulés par Akt (134). La façon par laquelle les cellules répondent habituellement à l'activation des FoxO est par l'établissement d'un arrêt de croissance (135). Un tel état de quiescence permet un taux métabolique favorisant la survie cellulaire dans des conditions de stress, ce qui se traduit en une augmentation de la longévité. La longévité et, en contre partie, le vieillissement sont intimement reliés aux différentes formes de stress qui aboutissent plus souvent qu'autrement sous forme de stress oxydatif. Ainsi, la protection des cellules quiescentes se fait en partie par l'augmentation des niveaux de la MnSOD et de la catalase, deux enzymes avec des propriétés anti-oxydatives (136, 137). Malgré tout, plusieurs études tendent à démontrer que les FoxO

régulent l'apoptose *in vivo* (83, 138, 139), allant à l'encontre du rôle bien établie des FoxOs dans la longévité.

Les raisons pour lesquelles les FoxOs induisent un arrêt de croissance dans certains types cellulaires plutôt que l'apoptose ne sont pas complètement comprises. Cependant, Ramaswamy et al. ont démontrés que les FoxOs pouvaient induire un arrêt de croissance indépendamment de leur domaine de liaison à l'ADN tandis et qu'ils induisaient l'apoptose dépendamment de ce dernier (140). De plus, d'autres études montre que SIRT1, une déacétylase promouvant la longévité, déacétyle les FoxOs ce qui atténue la réponse apoptotique tout en intensifiant l'induction de l'arrêt de croissance (141). Il serait donc possible que la déacétylation par SIRT1 diminue l'affinité des FoxOs pour l'ADN, faisant ainsi pencher la balance vers une réponse anti-apoptotique qui se traduirait par une augmentation de la longévité.

3.5.2. Contrôle du cycle cellulaire

3.5.2.1. FOXM1 et le contrôle de la transition G₂/M

La progression dans les différentes étapes du cycle cellulaire est coordonnée par une vague d'expression périodique de plusieurs gènes qui, elle, est gouvernée par des programmes transcriptionnels (103). De tels programmes, qui sont contrôlés par un seul complexe de facteurs de transcription (142, 143), ont été identifiés chez la levure *S. cerevisiae*. Le premier qui régule la transition G₁/S, dépend de l'activité du complexe transcriptionnel composé de SBF/MBF (144) et le second qui dépend du complexe formé de FKH/Mcm1/Ndd1, régule l'expression des gènes du cluster CLB2, spécifique à la phase G₂/M (103). L'expression des gènes du cluster CLB2 est contrôlée par deux facteurs de transcription forkheads, Fkh1-2, en complexe avec leurs co-activateurs (103, 145, 146). Récemment, une étude chez la souris a démontré que Foxm1 régulait un bon nombre de gènes mitotiques qui chevauchent avec le cluster CLB2 (147), donnant ainsi les premières

évidences qu'un tel programme transcriptionnel, contrôlé par les forkheads, est présent chez les eucaryotes supérieurs.

3.5.2.1.1. Foxm1 promouvoit la prolifération et ses niveaux d'expression sont régulés en fonction du cycle cellulaire

Les niveaux d'expression de Foxm1 semble corrélé avec l'état de prolifération des cellules puisque son expression est négativement régulée dans les cellules quiescentes ou en différenciation terminale tandis qu'il est induit lorsque les cellules sont incitées à entrer dans le cycle cellulaire (148-150). Conséquemment, suite à une hépatectomie partielle, Foxm1 est induit dans les hépatocytes proliférant durant la régénération du foie (150). Le rôle de Foxm1 dans ce processus a été clairement démontré à l'aide de souris transgéniques exprimant spécifiquement le transgène de Foxm1 dans le foie adulte, sous le contrôle du promoteur de la transthyretin (151). L'expression prématurée de Foxm1 dans les hépatocytes en régénération mène à l'initiation précoce de la réplication de l'ADN et de la mitose. Par contre, lorsque le transgène est exprimé dans les hépatocytes quiescents aucune prolifération anormale n'est observée. De plus, l'ablation spécifique du gène de Foxm1 dans le foie de souris adulte mène à une réduction significative de la prolifération des hépatocytes après une hépatectomie partielle (152). Ainsi, Foxm1 promouvoit la prolifération cellulaire, mais requiert les signaux mitogéniques appropriés afin d'être activé.

L'expression de Foxm1 est aussi régulé durant le cycle cellulaire, étant initié à l'approche de la phase S et continuant tout au long de la phase G₂ et la mitose (150). D'autres études ont démontré que l'activité transcriptionnelle de Foxm1 était aussi régulée dépendamment du cycle cellulaire et qu'elle corrélait avec le niveau de phosphorylation de la protéine, atteignant un maximum en phase G₂ du cycle cellulaire. Alors que les premières évidences tendaient à démontrer que Foxm1 était principalement phosphorylé en mitose (153), des études récentes indiquent que foxm1 est phosphorylé par les complexes CDK-cyclines tôt durant la phase G₁ et continue tout au long de la phase G₂ et M du cycle cellulaire (111, 154).

3.5.2.1.2. *L'activité de Foxm1 est régulé durant le cycle cellulaire*

L'activation de Foxm1 nécessite sa liaison aux cyclines, via un motif LXL présent dans sa portion carboxy-terminale, ce qui permet une phosphorylation efficace par les CDKs (111). Foxm1 s'associe préférentiellement au complexe Cycline E-Cdk2 durant la phase G₁ et S alors qu'il s'associe plutôt avec le complexe cycline B-Cdk1 en phase G₂. La phosphorylation dépendante des CDKs dans la portion carboxy-terminale de Foxm1 est importante pour son activation transcriptionnelle puisqu'elle permet le recrutement du co-activateur CBP/p300. La voie de signalisation de Ras-MAPK joue aussi un rôle important dans l'activation de Foxm1 puisque sa phosphorylation par MAPK régule sa translocation nucléaire ainsi que son activité transcriptionnelle (90). L'inhibition pharmacologique de la voie Ras-MAPK résulte en une rétention cytosolique et à une forte diminution de la transcription des gènes cibles de Foxm1.

En plus de s'associer avec les complexes CDK-cyclines, Foxm1 lie d'autres protéines régulant le cycle cellulaire. Il s'associe avec l'inhibiteur du cycle cellulaire pRb en phase G₁ et à Cdc25B, une phosphatase activant les CDKs, en G₁/S (111). Curieusement, l'activation de Foxm1 par Cdc25B agit comme boucle de rétro-activation puisque Foxm1 régule ensuite l'activation transcriptionnelle de cette dernière. Finalement, le suppresseur de tumeur p19ARF interagit, via ses résidus 26 à 44, avec le domaine de transactivation de Foxm1 et inhibe son activité transcriptionnelle (155). p19ARF inhibe directement Foxm1 en interférant avec son domaine de transactivation et/ou en modulant sa localisation nucléaire. De fait, p19ARF semble rediriger Foxm1 au nucléole ce qui empêcherait l'activation de ses gènes cibles. Ainsi, tant l'expression que l'activité transcriptionnelle de Foxm1 dépendent de la progression dans le cycle cellulaire, ce qui en fait un candidat idéal pour réguler ce même processus.

3.5.2.1.3. *Cibles transcriptionnelles de foxm1 dans la transition G₂/M*

Tel qu'indiqué précédemment, Foxm1 active directement la transcription de plusieurs gènes requis pour la transition G₂/M. Or, les MEFs provenant des souris

homozygotes nulles pour Foxm1 ainsi que les cellules d'une lignée cancéreuse humaine dont les niveaux d'expression de Foxm1 ont été réduits à l'aide de siRNA présentent une multitude de défauts du cycle cellulaire résultant en une sénescence cellulaire et/ou une mort cellulaire prématurée (147, 156, 157). Les cellules déficientes pour Foxm1 présentent un arrêt prolongé en phase G₂ indiquant un échec d'entrée en mitose qui est due à l'incapacité d'induire les gènes promouvant la transition G₂/M tels que la cycline B, Plk-1, Cdc25B et la kinase Aurora, tous connus pour leur importance dans la progression mitotique (147, 155, 158, 159). Notamment, l'expression ectopique de la cycline B a pu restaurer partiellement les défauts d'entrée en mitose, indiquant que la cycline B est une cible essentielle de Foxm1 pour cet aspect du cycle cellulaire.

De plus, la fraction de cellules qui réussit à initier la mitose présentent plusieurs anomalies mitotiques incluant des aberrations du fuseau mitotique, une mauvaise ségrégation des chromosomes et un point de restriction du fuseau mitotique (spindle checkpoint) déficient. Ces défauts peuvent être, en partie, attribués à un faible niveau d'expression de la protéine CENP-F dans les cellules déficientes pour Foxm1 (147). CENP-F est une protéine liant les kinétochores qui semble être importante pour la machinerie du point de restriction du fuseau mitotique. En effet, les cellules déficientes en CENP-F présentent des défauts de ségrégation des chromosomes similaire à ceux retrouvés chez les cellules déficientes pour Foxm1 (147, 160, 161). Finalement, la privation de Foxm1 mène à l'amplification des centrosomes et à la polyploïdisation qui sont causées par l'endoréplication suite à une division cellulaire ou une cytokinèse incomplète (147, 156, 157). En somme, il est clair que Foxm1 joue un rôle crucial dans l'établissement du programme de progression cellulaire à la barrière G₂/M et le maintien de l'intégrité du génome.

Cependant, bien que Foxm1 soit nécessaire au maintien de l'intégrité génome, son pouvoir prolifératif lui confère des propriétés oncogéniques. Or, il a été démontré que plusieurs lignées cellulaires dérivées de tumeurs expriment de hauts niveaux de Foxm1 et qu'ils participent activement au développement de ces tumeurs (156, 162, 163). De ce fait,

les modèles de souris transgéniques du cancer de la prostate démontrent un développement accéléré de cancer lorsqu'elles expriment des niveaux élevés de Foxm1 (163) tandis qu'elles démontrent une réduction du nombre et de la grosseur des adénomes de poumon lorsque Foxm1 est supprimé (162). De plus, Foxm1 contribue à la transformation cellulaire par le virus du papillome humain HPV-16 (164) et des cancers épithéliaux mammaires puisque ses niveaux d'expressions sont spécifiquement élevés comparativement aux tissus normaux et aux cancers bénins (156). Finalement, le locus de Foxm1, 12p13, est fréquemment amplifié dans les adénocarcinomes (165), les carcinomes naso-pharyngaux (166) et de la tête et du cou (167), tandis que les niveaux de Foxm1 sont augmentés dans plusieurs tumeurs solides (168).

3.5.2.2. Les autres membres Fox

La division cellulaire est aussi influencée par les membres de la sous-famille FoxO et ce, à deux niveaux séparés. Premièrement, les facteurs de transcription FoxOs préviennent l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Cette quiescence est maintenue, afin d'empêcher l'entrée en phase S, par l'induction des CKIs p27^{Kip1} et p21^{Cip1} qui inhibent les complexes Cdk2-Cycline E et Cdk4-cycline D, respectivement (107, 169). L'induction de p130, un membre de la famille des rétinoblastomes, par les FoxOs prévient l'activation transcriptionnelle dépendante de E2F4 d'une multitude d'inducteurs de l'entrée dans le cycle cellulaire (136). La stimulation de la cycline G₂, spécifiquement exprimée dans les cellules quiescentes, accompagnée de la répression des trois isoformes de la cycline D renforce cet état de quiescence (140, 170, 171). Deuxièmement, les facteurs FoxOs semblent avoir des rôles contradictoires dans la régulation de la phase G₂/M. Durant la phase G₂, ils augmentent l'expression de la cycline B et de Plk1 (172), tous deux requis pour l'entrée et la complétion de la mitose. Cependant, il a été démontré que FoxO3a pouvait induire un délai en phase G₂ et d'entrée en mitose possiblement en régulant les niveaux de GADD45 α , un composant du point de restriction de la transition G₂/M (173). De plus, une autre étude a démontré que les FoxOs, bien qu'ils induisaient un délai en G₂,

avaient un impact mineur sur l'induction de la cycline B et de Plk1 et que Foxm1 était le principal inducteur (147).

Curieusement, les différents membres des familles de CKIs semblent être des cibles communes des différents facteurs forkheads. En plus de FoxM1 et des différents FoxOs; FOXA1, Foxg1 et Foxk1 ont été impliqués dans la régulation de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} (21, 174, 175).

3.6. La sous-Famille FOXN

Très peu d'informations ont été recueillies jusqu'à présent sur la sous-famille FOXN qui est composée de 6 membres : FOXN1 (WHN), FOXN2 (HTLF), FOXN3 (CHES1), FOXN4, FOXN5 (FOXR1) et FOXN6 (FOXR2) (176). FOXN2 a été le premier membre de la famille à être découvert et ce, comme un facteur liant le LTR du virus de la leucémie des cellules T humaine (HTLV) (177), mais son rôle tant au niveau de l'organisme que cellulaire n'a toujours pas été déterminé. FOXN1 est sans contredit le membre de la sous-famille le plus étudié et a été identifié comme le gène responsable du phénotype de nudité chez la souris (178). Ces souris sont caractérisées par une nudité macroscopique, une malformation des ongles et un défaut de la thymopoïèse donnant lieu à des immunodéficiences. Il a été démontré que FOXN1 régule la différenciation des onychocytes (179), des kératinocytes (121) et des cellules épithéliales thymiques (180) donnant ainsi naissance aux ongles, aux cellules de la peau et au thymus, respectivement.

Comparativement aux sous-familles FoxO et FoxA, où chacun des membres régulent le cycle cellulaire et le métabolisme, respectivement (section 3.5 et 3.5.2.2), le seul lien reliant certains membres de la sous-famille FoxN jusqu'à présent implique le développement de l'œil. En effet, une étude a pu démontrer que FoxN2-3-4-5 étaient exprimés durant le développement embryonnaire de *Xenopus laevis* et qu'ils étaient principalement exprimés dans l'œil (181). L'expression oculaire spécifique de FoxN4 a été confirmée dans le poisson zèbre *Danio rerio* (182) et chez la souris (183). Par la suite, il a

été démontré que Foxn4 contrôlait la spéciation des progéniteurs rétiniens en cellules amacrines et horizontales puisque ces types cellulaires sont absents chez les souris homozygotes nulles pour Foxn4 résultant en une dysplasie rétinienne (91). Le rôle de CHES1/FoxN3 dans le développement de l'œil a lui aussi été confirmé puisque l'inhibition de son expression à l'aide de morpholinos chez *Xenopus laevis* résulte en une réduction de la taille des yeux causée par une augmentation de l'apoptose (184). Foxn4 et FoxN3 s'ajoutent ainsi à la liste de gènes mutés, comprenant FOXC1, FOXC2, FOXE3 et FOXL2, attribuable à différents défauts oculaires (53). Ainsi, il semble évident que la sous-famille FoxN soit impliquée dans la biologie de l'œil bien que les rôles de Foxn2 et 5 restent à définir.

3.7. CHES1/FOXN3

Le gène de *foxn3*, qui est transcrit à partir du brin anti-sens du chromosome 14q31.11 chez l'humain (tableau 1), est constitué de sept exons qui s'étendent sur une distance de 457,77 Kb et donne naissance à deux transcrits. Le premier transcrit (NM_001085471), de 7856 paires de bases, code pour une protéine de 490 acides aminés, FOXN3a, d'un poids moléculaire prédit de 53 kDa avec un point isoélectrique de 6,63 (NP_001078940.1). Le deuxième transcrit (NM_005197), produit par épissage alternatif du cinquième exon diffère aussi dans sa région du 5' UTR et produit un isoforme plus court de 22 acides aminés, FOXN3b (# NP_005188.2) (voir figure 12). Notons aussi la présence d'un pseudogène de 1477 paires de bases en position q22.1 du chromosome X. De plus, 5 régions de la séquence codante de CHES1 montrent un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNPs). Bien qu'aucun ne soit relié à une maladie, deux d'entre eux sont silencieux alors que les trois autres provoquent un changement d'acides aminés D91E, Y337H et E338A (Ensembl). Par contre, une étude a identifié une lignée cellulaire de cancer du colon, COLO320DM, homozygote pour une substitution de base G→A en position 1189 du gène de CHES1, provoquant un changement d'acide aminé D396N (185). Ainsi, il est tentant

d'avancer que CHES1 pourrait être impliqué dans la tumorigenèse bien qu'on ne sache si cette mutation inactive ou si elle procure un gain de fonction à CHES1.

L'alignement de séquences et les analyses phylogénétiques révèle que FOXN2 est le plus apparenté à CHES1, avec 43% d'homologie sur toute sa séquence, alors que FOXN1 et 4 conserve un bon degré d'homologie, mais seulement au domaine de liaison à l'ADN de CHES1. Mis à part son domaine de liaison à l'ADN très conservé, aucun autre domaine protéique n'a été caractérisé chez CHES1 à ce jour. Cependant, CHES1 possède quelques régions dites de faible complexité qui peuvent parfois être associées à l'activité transcriptionnelle (voir figure 12). Aussi, à l'aide des programmes de bio-informatique (BLAST, Ensembl, ProSITE, PredictNLS), il est possible d'identifier un signal de localisation nucléaire potentiel dans la portion carboxy-terminale de CHES1 entre les acides aminés 418 à 445 (voir figure 12). Tel qu'indiqué à la section (3.1.3), plusieurs forkheads possèdent un SLN dans la portion N- et/ou carboxy-terminale de leur domaine de liaison à l'ADN. Pour sa part, CHES1 ne possède pas le SLN présent dans la partie carboxy-terminale des FOXOs, mais semble posséder celui en N-terminale qui a tout d'abord été identifié chez FOXJ2 (79) (voir figure 6).

Quelques études semblent impliquer CHES1 dans le métabolisme (186, 187). En effet, le locus IDDM11 a été associé à une susceptibilité au diabète insulino-dépendant et ce locus localise à la position chromosomique 14q24.3-q31, couvrant le gène de CHES1 (186). De plus, CHES1 fait parti d'un groupe de gènes (QTL) relié au contenu de gras intramusculaire identifié chez le porc, *Sus scrofa* (187). Malgré tout, CHES1 a été identifié dans le criblage d'une banque d'ADNc ayant pour but d'identifier de nouveaux régulateurs du point de restriction en G₂. Cet ADNc a été nommé CHES1 (pour Checkpoint suppressor 1) puisqu'il pouvait supprimer plusieurs phénotypes associés à la mutation de différents gènes impliqués dans l'orchestration du point de restriction en réponse aux dommages à l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae* (188). En effet, les levures mutantes pour *mecl1* (ATR), *rad9* (53BP1), *rad53* (Chk1), *dun1* ou *rad24* survivaient mieux aux dommages à

l'ADN, induits par les rayons UV, les radiations ionisantes et le MMS, lorsqu'elles surexprimaient CHES1.

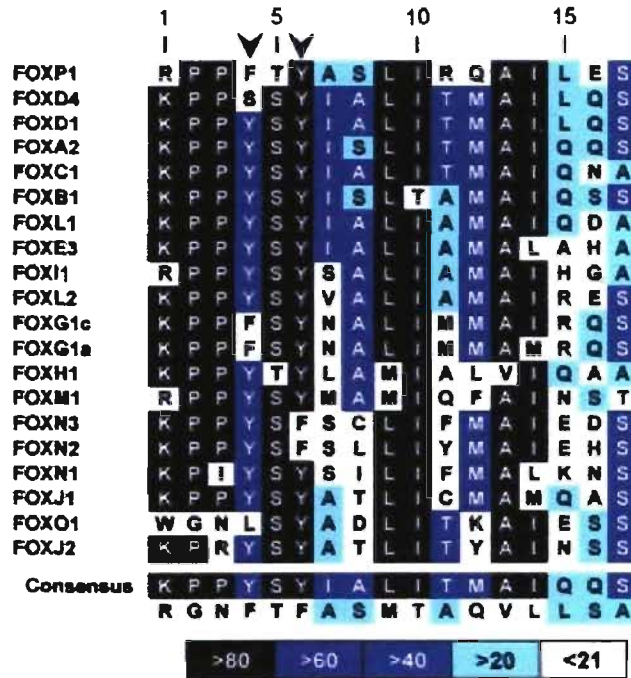


Figure 6. Alignement des séquences d'acides aminées de la partie N-terminale du domaine de liaison à l'ADN de plusieurs Forkheads.

Les résidus en noir indique qu'ils sont conservés à plus de 80%, ceux en bleus avec des points à plus de 60%, ceux en bleus à plus de 40%, ceux en turquoise à plus de 20% tandis que ceux en blanc sont conservés à moins de 21%. Les tyrosines importantes pour la translocation nucléaire sont indiquées par des flèches. Adapté de (79).

Cependant, CHES1 n'avait aucun effet dans les levures déficientes pour rad52 et rad6 (UBE2), impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN (188). De plus, la surexpression de CHES1 dans les levures de type sauvage n'avait aucun effet. Les auteurs ont par la suite démontré que la suppression de la létalité des mutants était due à la reconstitution du point de restriction en G₂ et qu'elle n'était pas dépendante de l'induction transcriptionnelle de gènes de réponse aux dommages à l'ADN, ni à la synthèse de nouvelles protéines (188). En effet, l'ADNc utilisé dans cette étude codait pour une forme tronquée de CHES1, n'exprimant que la portion en carboxy-terminale du domaine

Forkhead. Étonnamment, CHES1 ne possède pas de domaine FHA que l'on retrouve dans une multitude de protéines impliquées dans les voies de signalisations aux dommages à l'ADN (102). Ainsi, les auteurs ont proposé que CHES1 agissait en induisant un point de restriction alternatif, indépendant de MEC1 (ATR).

Par la suite, le mécanisme par lequel CHES1 pouvait induire un délai en phase G₂ a été élucidé (189). Il a été démontré que la forme tronquée de CHES1 (acides aminés 292 à 490) interagissait avec et inhibait Sin3 chez *S. cerevisiae*, un composant du complexe des histones déacétylases Sin3/Rpd3. En outre, la délétion de SIN3 ou RPD3 dans les souches de levures déficientes pour *mecl* ou *rad9* supprime la sensibilité des levures et restaure le point de restriction en G₂ (189), de façon similaire à la surexpression de CHES1 (188). Inversement, la surexpression de Sin3 empêche le délai en phase G₂ induit par la surexpression de CHES1. Finalement, l'intégrité du point de restriction du fuseau mitotique est nécessaire pour supprimer la létalité des levures double mutante (*rad9/SIN3*). Les auteurs ont démontré que la délétion subséquente de MAD1, dans les souches doubles mutantes, resensibilise les levures aux dommages à l'ADN. Ainsi, il a été proposé que l'inhibition de la déacétylation des histones, encourue par la perte de SIN3 ou RPD3, active le point de restriction du fuseau mitotique dépendant de MAD1 suite aux dommages à l'ADN et ce, lorsque le point de restriction aux dommages à l'ADN est inactivé par la mutation de MEC1.

Cependant, les résultats provenant de ces deux études doivent être appréciés avec précaution. En effet, les levures ne possèdent pas d'orthologue de CHES1 ce qui laisse croire que l'action de CHES1 dans ce système peut être le résultat d'une interaction non-spécifique entre des protéines de levures endogènes (SIN3/Rpd3) et une protéine hétérologue surexprimée (CHES1). De plus, la surexpression de CHES1 dans les levures mutantes pour *mecl* et *rad9* n'avait aucun effet sur la sensibilité des levures traitées à l'hydroxyurée (HU) (188), alors que la délétion de Sin3 ou Rpd3 supprime la sensibilité des levures suite à ce traitement (189). Aussi, l'interaction détectée entre CHES1 et Sin3 l'a été dans des conditions normales et non pas de façon spécifiques en réponse aux dommages à

l'ADN. Il est donc probable que CHES1 joue un rôle différent ou bien qu'il ait d'autres rôles dans les cellules de mammifères.

Toutefois, l'implication de CHES1 dans les voies de dommages à l'ADN a été confirmée dans un système murin et chez la drosophile (190). Cependant, contrairement à l'arrêt de croissance en G₂ induit chez la levure, CHES1 restaure l'arrêt en phase S qui est inopérant suite aux dommages à l'ADN dans les cellules déficientes pour MEN1, tant chez la drosophile que chez la souris (190). Dans cette même étude, ils ont démontré une interaction directe entre la partie carboxy-terminale de MEN1 et CHES1. L'interaction requiert les 291 premiers acides aminés de CHES1 puisque la protéine tronquée de CHES1 utilisée dans les levures (292 à 490) ne peut s'associer à MEN1 (190).

La première étude portant sur CHES1 dans les cellules humaines indique que la portion carboxy-terminale de CHES1, utilisée dans les études précédentes, agit comme un répresseur transcriptionnel lorsqu'elle est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (191). À l'aide du double hybride, Scott et al. ont démontré que cette portion de CHES1 interagit avec l'adaptateur transcriptionnel, SKIP (191). SKIP peut fonctionner en tant qu'activateur ou répresseur dépendamment du type cellulaire et des promoteurs auxquels il se retrouve. Malgré tout, il a été démontré que SKIP recrutait de multiples complexes répresseurs, mais surtout qu'il pouvait recruter mSin3a (192), faisant ainsi un lien direct entre les résultats obtenus dans les levures. Dans le même ordre d'idée, MEN1 agit aussi comme co-modulateur transcriptionnel et peut s'associer à mSin3a (193, 194). De ce fait, il est possible que CHES1 induise un arrêt de croissance tant en phase S, en interagissant avec MEN1, qu'en phase G₂, en interagissant avec SKIP, en réprimant l'expression de gènes cibles via l'activité des histones déacétylases. De plus, les niveaux de CHES1 sont augmentés par un autre facteur de transcription, KLF4, ayant un rôle bien établi dans les points de restrictions de la transition G₁/S et G₂/M (195).

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Depuis la découverte en 1997 que la sénescence avait le potentiel de protéger les cellules contre le stress oncogénique et ainsi défendre l'organisme contre l'apparition éventuelle de cancers, l'importance accordée à ce mécanisme anti-tumoral fût éclipsée par l'intérêt monopolistique de la communauté scientifique envers l'apoptose. Malgré tout, certains laboratoires ont persévéré et force fût de constater que le rôle joué par la sénescence dans la suppression tumorale était autant indispensable que celui de l'apoptose. Les recherches grandissantes sur ce phénomène amenèrent de plus en plus de questions sur les bases moléculaires du contrôle de ce processus.

Bien que l'on croyait que tous les oncogènes activaient la sénescence de façon similaire (via l'activation de p53 et l'augmentation des niveaux de la protéine p16^{INK4a}), l'étude au laboratoire de la sénescence induite par l'oncogène STAT5A1*6 a démontré le contraire. Nous avons donc entrepris d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans ces différences moléculaires. À cette fin, nous avons tout d'abord comparé le profil d'expression génétique de cellules sénescents induite par STAT5A1*6 à celui de cellules en division active. Nous avons constaté que quelques gènes n'ayant, jusqu'à présent, jamais été relié au processus de sénescence était significativement régulé dans ce processus.

L'un d'entre eux a particulièrement attiré notre attention puisqu'il semblait être impliqué dans le contrôle des points de restrictions suite aux dommages à l'ADN, une caractéristique fondamentale de la sénescence. Ce gène, codant pour un facteur de transcription de la famille des forkheads nommé CHES1, était d'autant plus attrayant puisque pratiquement aucune étude à son attention n'a été publiée depuis sa découverte en 1997. De plus, le rôle de cette protéine dans les cellules humaines n'avait jamais été investigué puisque les quelques études ont été réalisées dans les levures. Ainsi, mon projet de maîtrise consistait à déterminer l'implication potentielle de CHES1 dans le phénomène de sénescence cellulaire et d'étudier son rôle dans les cellules humaines.

RÉSULTATS

ARTICLE: Regulation of the cell cycle and cellular senescence by the forkhead transcription factor CHES1/FOXN3.

Mise en contexte

L'étude de la sénescence induite par les oncogènes a démontré que les bases moléculaires permettant l'établissement de ce programme d'arrêt de croissance permanent pouvaient diverger. Ainsi, l'identification de nouveaux gènes impliqués dans ce processus aura un impact significatif dans la compréhension générale du phénomène et des troubles reliés à son dysfonctionnement.

La présente étude identifie CHES1 comme un gène impliqué dans la sénescence oncogénique et semble agir en régulant la transition de la phase G₂ à la phase M. Cette étude représente aussi les premières analyses de cette molécule dans les cellules humaines.

Cet article sera soumis sous peu à PNAS

Note: Contribution(s) des auteurs :

LD : Culture cellulaire, infections des cellules primaires, génération des mutants de délétion, essais de formation de colonies, essai β -gal, courbe de croissance, purification d'ARN, RT-PCR, immunobuvardage, quantification des immunofluorescence, essai luciférase et participation à l'écriture du manuscrit.

FAM : Immunofluorescence sur les fibroblasts primaires et aide pour les infections


GF: supervision générale et écriture du manuscrit

Regulation of the cell cycle and cellular senescence by the forkhead transcription factor CHES1/FOXN3.

Laurent Doucet, Frederick A. Mallette and Gerardo Ferbeyre

Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Correspondence to:

Gerardo Ferbeyre, MD, PhD
Université de Montréal
Département de Biochimie, E-515
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, Qc H3C 3J7
Phone 514 343-7571
Fax 514 343-2210
Email: 

Abstract

Senescence is a state of stable cell cycle arrest where cells undergo various morphological and genetic changes. Senescence can be induced *in vitro* and *in vivo* by different oncogenes such as RasV12 and STAT5A1*6 and have been linked to aging. Although its relevance to tumour suppression is well established, the molecular basis linking senescence to aging remains elusive. The only significant marker attributable to both phenotype is p16^{INK4a} expression. Here, we describe the identification of a novel regulator of senescence that could contribute to the aging phenotype. We show that CHES1 is capable of inducing senescence in primary fibroblasts and that its expression is up-regulated during murine aging. These effects seem to be mediated by inhibition G₂/M specific genes, particularly FOXM1 and its target genes, as FOXM1 is the most downregulated gene during human aging. Together, these data propose a role for CHES1 in the transition from G₂ to M phase and when its expression is aberrant it can induce senescence and contribute to organismal aging.

Introduction

Adult multicellular organisms restrict the process of cell proliferation to specialized stem cells, their immediate progeny and some specialized cell types that keep their cell division potential after cell differentiation. Most of these cells are kept in control by several mechanisms that prevent cell cycle progression but allow re-entry into the cell cycle when more cells are needed. However, this process is not eternal because cells can lose their proliferation potential due to a variety of stressors. One important factor associated to a loss of proliferative potential is the aging of the organisms. So far, the exact source of damage and the mechanisms leading to loss of proliferation potential with age are unknown.

Growing cells in culture have provided a model to study the molecular mechanisms leading to loss of proliferative potential. In particular normal human cells display a limited division potential in culture due to telomere erosion, expression of oncogenes or increased activity of certain tumor suppressors. This process has been dubbed cellular senescence and recent data indicates that its underlying cause is some form of DNA damage that activates the DNA Damage Response (DDR) (1-4). The activation of the DDR can be easily identified by the presence of DNA damage foci, which accumulate phosphorylated forms of several proteins involved in the response to DNA damage. These DNA damage foci have been identified in tissues from old rodents (5) and primates (6) and they correlate with the accumulation of cells that can be stained for a marker of cellular senescence: the senescence associated β galactosidase (7). Also, old organisms accumulate somatic mutations and genomic rearrangements that may be the consequence of DNA damage and/or a decrease in DNA repair (5, 8-10).

It is not known whether the DDR is the initial trigger of cellular senescence in old individuals or whether they are the consequence of an underlying initial stress. It has been proposed that mitochondrial production of ROS is the actual trigger of DNA damage and the aging process (11). At the cellular level, both ROS and DNA damage induce cellular senescence, which could be the link between aging at the molecular level and aging of the

organism (12, 13). Senescence may cause aging by preventing the generation of new cells to compensate for normal cell losses. In addition senescent cells may affect normal physiology by its secretion products, many of them cytokines (13, 14).

Constitutive signaling by GH has also been demonstrated to lead to premature aging in rodents (15) and this phenotype correlates with loss of replicative potential of cells from several tissues in these animals (16). Again, there is no evidence for an increase in GH levels with age. However, there is widespread evidence that aging is accompanied by an increase in the levels of cytokines and inflammatory mediators such as IL-6 (17). It is unknown how high levels of cytokines may lead to the widespread tissue dysfunction and lost of proliferative potential associated to aging. However, if cellular senescence is the link between molecular alterations and organismal aging, a plausible hypothesis is that aberrant cytokine signaling may lead to cellular senescence. Many cytokines affect cell functions by activating the Jak/STAT signaling pathway. As an initial test of the cytokine model of senescence we expressed a constitutively active allele of STAT5 (ca-STAT5A) (18) in both fibroblasts and epithelial cells. Ca-STAT5A induced cellular senescence and the accumulation of DNA damage foci in normal human and rodent cells (4). We think that the molecular characterization of the cellular response to constitutively active STAT5 may give us clues to understand aging.

Here we present the transcription factor FOXN3/CHES1 as a mediator of the cellular response to constitutively active STAT5. FOXN3 is highly expressed during the senescence response to STAT5 when compared with young normal growing cells. FOXN3 is also highly expressed in the liver from old rats in comparison with livers from young rats. Caloric restriction, a procedure that delays aging in rats decreased the expression of FOXN3 in old livers. FOXN3 is in itself capable of inducing senescence suggesting a potential mechanism for its role during aging. A gene expression profile of normal fibroblasts expressing FOXN3 revealed a pattern of gene expression very similar to that obtained from old individuals. FOXN3 seemed to repress a large number of genes involved in the transition from G2 to M during the cell cycle. Many of these genes are known targets

of another forkhead protein, FoxM1. FOXN3 was able to block FoxM1 activity of a promoter containing forkhead binding sites, suggesting that its molecular mechanism is to act as a repressor of FoxM1 regulated genes. In agreement, cells expressing FOXN3 often display multiple nuclei, a marker of a cytokinesis defect previously described in Foxm1 null cells. The implications of these results for aging and tumor suppression are discussed.

Results and Discussion

CHES1 is a senescence-regulated gene

In an attempt to better characterize molecular mechanisms underlying oncogene-induced senescence (OIS), we sought to identify molecules that were differently regulated in this process by comparing genetic profiles of STAT5A1*6-senescent cells to their actively growing counter parts. STAT5A1*6-senescent cells showed increased expression of known STAT5-regulated genes and senescence-specific genes such as the Suppressors Of Cytokine Signaling (SOCS) family SOCS1, BclXL and Pim2 (Malette and Ferbeyre unpublished). The gene CHES1/FOXN3, with an average induction of 4,6 fold, seemed to be a relevant candidate gene for a regulator of senescence in STAT5A-expressing cells since it had been implicated in the G₂ checkpoint in the yeast *S. cerevisiae* (19).

To validate the results seen in the microarray, CHES1 expression was verified in both ras- and STAT5A1*6-induced senescent cells. CHES1 mRNA (figure 1A) and protein levels (figure 1B) were specifically up-regulated in both senescent cells, although to a lesser extent in ras-senescent cells.

Since senescence has been tightly linked to aging, we hypothesized that CHES1 levels would also increase during this process just as the tumor suppressor protein p16^{INK4a}. CHES1 mRNA levels were analyzed by real-time PCR and we can see in figure 1C that 19 months old rats express higher levels of CHES1 than their younger siblings, concomitant

with p16^{INK4a} expression. This increase can be reduced by the anti-aging effects of caloric restriction as 19 months old rats on diet had a lesser increase in CHES1 mRNA levels compared to 19 months old *ad libitum*-fed rats. Thus, CHES1, like p16^{INK4a}, is part of a small list of genes whose expression is both increased during cellular senescence in culture and aging *in vivo*.

CHES1 regulates growth of normal and tumor cells

To study whether CHES1 is an active player during cellular senescence, we cloned its mRNA from STAT5-senescent cells using RT-PCR. We isolated two different isoforms (CHES1 Long and CHES1 Short) which we cloned into a retroviral vector to study their effect on the cell cycle. Introduction of either CHES1L or CHES1S in BJ and IMR90 fibroblasts, through retroviral-mediated gene transfer, resulted in a decreased cell growth over 8 days after selection, with CHES1S being a little bit more effective in reducing proliferation (Figure 2A and data not shown). This decreased cell proliferation was accompanied by an increase in SA- β -gal positive cells compared to control cells (figure 2B and C). However, contrary to oncogenic-induced senescence, where SA- β -gal positive cells accumulate over time to reach a maximum at day 8 post-selection, SA- β -gal positive CHES1-infected cells decrease proportionally with time (figure 2C). This phenomenon was likely not a consequence of cells evading the senescence program. Rather, non-senescent cells never stopped dividing, and thus, reduced the % of total cells stained positive for SA- β -gal activity. Moreover, overexpression of the tumor suppressor p53 itself, which is central for the establishment of the senescence program, doesn't induce senescence but rather arrest cell for 3 days before resuming growth (20). However, in the presence of oncogenic signals, p53 becomes a senescence regulator, because oncogenes induce DNA damage that activate p53 via post-translational modifications (4). Hence, it is plausible that the antiproliferative properties of CHES1, like p53, are increased in the presence of oncogenic signals. To test this idea, we looked at CHES1's ability to reduce growth of the

U2-OS osteosarcoma cell line. CHES1L and S were able to reduce colony formation of this cell line in transient transfection assay (figure 2D). Together, these results suggest that CHES1 act as a tumor suppressor protein.

CHES1 localize to the nucleus dependently of 2 distinct nuclear localization signals (NLSs)

We next wanted to determine the functional domains required for CHES1-mediated cell growth arrest. To this end, we generated multiple deletion mutants lacking the N or C-terminal domain in combination or not with the Forkhead DNA-binding domain (DBD) (figure 3A). According to the Predict NLS software CHES1 possesses a NLS in the C-terminal domain between residues 418 to 445 (21) and figure 3A). For this reason, we studied the subcellular distribution of the different mutants before analyzing their functional properties. CHES1L and S localize almost entirely to the nucleus of the cells (figure 3B and C). However, mutants lacking the C-terminal domain showed only a partial nuclear staining with 58% of cells with nuclear staining for the ΔC mutant and only 22% for the ΔFC mutant (Figure 3B and C). These results suggest that the NLS identified by the bio-informatic program was functional. Yet, if we look at the ΔFN mutant, which still possess the C-terminal NLS, we observe a small but significant decrease in the number of nuclear stained cells compared to wild type CHES1 suggesting that another module in the first 205 amino acids regulates sub-cellular localization (figure 3A and C). Comparison of the ΔC and ΔFC mutants confirms that a functional NLS is present in the Forkhead DBD, since deletion of this domain results in a 50% reduction of nuclear staining (figure 3C). Furthermore, studies of another forkhead gene, FOXJ2, identified a region of 17 amino acids in the N-terminal part of the DBD, that is also present in CHES1 DBD, that regulates sub-cellular localization (3).

Since the C-terminally truncated proteins do not localize to the nucleus at the same extent as the N-terminally truncated mutants or wild type CHES1, we introduced the SV40

NLS sequence at the C-terminus of these mutants to insure that the subcellular localization would not influence our functional characterization. As we can see in figure 3C, the C-terminally truncated mutants bearing the SV40 NLS localize almost entirely to the nucleus. However, subcellular localization of the ΔN and DBD mutants was not determined as these mutants are expressed at very low levels that are barely detectable by western blots and could not be detected by immunofluorescence (figure 3D, see below). Thus, analysis of CHES1 deletion mutants allowed us to identify two functional NLSs.

CHES1 regulates cell growth through its DBD

In order to test the functional domains required for CHES1-mediated effects, we measured the capacity of all of the above mentioned deletion mutants to diminish colony formation of the U2OS cell line. Two conclusions can be drawn from this experiment. First of all, deletion of the Forkhead DBD in combination with any other domain abolished CHES1's effect (Figure 3E, third column and F). This was not a consequence of a difference in nuclear localization as ΔFC -NLS, which localizes to the nucleus at the same extent as the ΔFN mutant (figure 3C), cannot reduce colony formation compared to control vector. Interestingly, deletion of either the N- or the C-terminal domain alone had little or no effect on CHES1's capacity to reduce colony formation suggesting that CHES1 DBD is necessary to mediate its effects and that other domains are dispensable (Figure 3E, second column and F). Then, we wondered if CHES1 DBD was sufficient to reduce colony formation. As seen in the first column of figure 3E and F, CHES1 DBD was capable of reducing colony formation, implying that CHES1 might act by competing for sequences in promoters of its target genes.

Second, the N-terminal domain seems to be an inhibitory domain. CHES1 ΔN was as effective at reducing colony formation as wild type CHES1 although the ΔN mutant was expressed at levels barely detectable (figure 3D). This effect was not due to difference in transfection efficiency as levels of co-transfected GFP was similar for all mutants. This loss

of expression was reproducible as generation of CHES1 DBD mutant would lead to a dramatic change in protein expression. In agreement for a role as an inhibitory domain for the N-terminal part of CHES1, senescence induction was stronger with the ΔN mutant in IMR90 fibroblasts as 64,5% of cells stained positive for SA- β -Gal six days post-selection (figure 4C) compared to 25% for WT CHES1 at the same time point (figure 1C). Thus, domain analysis allowed us to identify an amino-terminal inhibitory domain and that CHES1 effects were mediated by its DNA binding domain.

CHES1 regulates G₂/M specific genes

We next determined CHES1-regulated genes that could account for growth inhibition and entry into senescence. To do so, we compared gene expression profiles of IMR90 cells infected with CHES1 cDNA compared to these same cells bearing an empty vector at day one after selection. Global gene expression profile confirmed data reporting that CHES1 was a transcriptional repressor (22), as 85% of genes significantly regulated were repressed. Among those repressed genes, many cell cycle regulatory genes could be associated with cell cycle arrest and/or senescence and act principally in the transition from G₂ to M phase. Table I lists genes whose expression is altered by CHES1, grouped into three families of protein according to their biological function. Genes of the mitotic cell cycle such as cyclin B and CDK1 were down-regulated 5 and 3,6 fold, respectively whereas p57^{KIP2} was up-regulated 3,8 fold. Diminished CDK activity accompanied with increased CKI levels could certainly explain the observed growth arrest. Interestingly, we found that another Forkhead family member, FOXM1, was decreased in CHES1 expressing cells. FOXM1 is the transcription factor regulating G₂/M transition and foxm1^{-/-} MEFs senesce prematurely, which could explain CHES1's ability to induce senescence. Since Forkheads usually bind very similar DNA sequences (TAAACA) and because CHES1 DBD is sufficient to reduce colony formation of U2OS cells (figure 3E), we hypothesized that CHES1 could regulate cell growth arrest and senescence by inhibiting FOXM1-regulated

gene through binding of FOXM1-regulated promoter sequences. Consistently, we found many FOXM1-regulated genes to be repressed in CHES1 infected cells such as cyclin B, survivin, CENPF and CENPA. Astoundingly, CHES1 expression profile showed unprecedented similarity to the one of aged fibroblasts in which the most down-regulated genes is FOXM1 (Table I marked with an asterisk), hence reinforcing our hypothesis.

CHES1 inhibits FOXM1 transactivation

To test the hypothesis that CHES1 could act through inhibition of FOXM1 transactivation, we used a luciferase reporter under the control of forkheads binding sites. Surprisingly, we found that CHES1 alone could not regulate luciferase expression as it is expressed at basal levels (figure 4A). Since CHES1 is a transcriptional repressor, one might argue that luciferase activity should decrease, rather this result is in agreement with CHES1 acting through competition. In fact, CHES1 decreases FOXM1's ability to transactivate luciferase expression driven by the forkhead promoter (figure 4A). FOXM1 inhibition is specific, as CHES1 cannot repress STAT5A on the β -casein reporter (figure 4B). Since CHES1 seems to act through inhibition of FOXM1 target genes, we wondered if activating these genes would reverse CHES1's ability to induce senescence. Since E7 was shown to augment FOXM1 transactivation (23), we co-infected IMR90 fibroblasts with CHES1 Δ N and the oncoprotein E7 and/or E6. As proposed above, CHES1 Δ N acts as a hyperactive mutant since it induces senescence in a higher proportion than WT at day 6 after selection. As expected, E7 was sufficient to bypass CHES1-induced senescence implying that increased FOXM1 activity accounts for this bypass (figure 4C). However, we cannot rule out the possibility that this bypass is caused by Rb inactivation or a direct inhibition of CHES1 by E7. Moreover, E6 was also sufficient to bypass CHES1-induced senescence indicating that p53 is necessary for this process. It is known that loss of FOXM1 leads to aneuploidy and centrosome amplification which can activate a p53-dependant checkpoint (24). Thus, loss of p53 would not disable CHES1 ability to repress FOXM1 target genes but rather, p53 null cells fail to detect the ensuing defects (figure 4D).

In conclusion, our works identifies CHES1 as a repressor of FOXM1-dependent genes and as a novel regulator of cellular senescence. High levels of CHES1 expression during aging may interfere with FOXM1-dependent gene expression and normal cell proliferation. Caloric restriction reduced CHES1 levels in the liver, suggesting that the control of CHES1 expression is relevant for normal aging.

Materials and methods

cDNAs and constructs

CHES1 cDNAs were cloned from reverse transcribed RNA (see protocol below) originating from STAT5-senescent cells. Both CHES1 Long and Short were PCR-amplified using an EcoRI tagged sense primer: 5'GATCGAATTCGCCATGGGTCCAGTCATGCCTCCC 3' and an XhoI tagged CHES1 anti-sense primer: 5'TCGACTCGAGTTAATTTTTGTGGTTTCCTTTTGC 3' and ultimately cloned into the EcoRI and XhoI restriction sites of the retroviral vector pLPC. From there, all CHES1 constructs were generated by PCR with pLPC-CHES1L as a template and cloned into the EcoRI and XhoI restriction sites of pLPC and included an N-terminal Flag tag (boldfaced letters). Primers used for the different CHES1 mutants are listed below: Full length Flag-tagged CHES1 was generated with Δ Fork-C sense :5'GTCAGAATTCGCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCATG GGTCCAGTCATGCCTCCC 3' and the CHES1 anti-sense primers. The Δ FC mutant: Δ Fork-C sense and Δ Fork-C anti-sense : 5'GTCACTCGAGTTACTGCCTGGCATCGTAGGGCATG 3'. The Δ Fork-C NLS mutant: Δ Fork-C sense and Δ Fork-C NLS anti-sense: 5'GTCACTCGAGTTATACCTTACGCTTCTTCTTTGGCTGCCTGGCATCGTAGG GCATG 3'. The Δ C mutant: Δ Fork-C sense and Δ C anti-sense: 5'GTCACTCGAGTTACTTTTTCAAAGCCTGAATTAGATTTTGTC3'. The Δ C-NLS

mutant: Δ Fork-C sense and Δ C-NLS anti-sense:
 5'GTCACTCGAGTTATACCTTACGCTTCTTCTTTGGCTTTTTCAAAGCCTGAAT
 TAG 3' The Δ N mutant: Δ N sense
 5'GTCAGAATTCGCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCAACCCCA
 ACTGCAAACCCCC 3' and CHES1 anti-sense. The Δ FN mutant:
 5'GTCAGAATTCGCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCACACCTT
 ATCACCCACACCCACACG 3' and CHES1-DBD: Δ N sense and Δ C-NLS anti-sense. All
 Sense primers contained a minimal Kozak sequence before the start codon. Restriction site
 sequences are underlined in the primers sequence. SV40 Nuclear Localization Signal (NLS)
 sequence is in underlined bold letter. All constructs were sequenced to insure that no
 mutations were introduced during PCR. pBabe-RasV12 and pBabe-STAT5A1*6 have been
 previously described. pLXSN, pLXSN-E6, pLXSN-E7 and pLXSN-E6/E7 were provided
 by Dr. D. Galloway (Fred Utchinson Cancer Research Center, University of Washington,
 Seattle, WA, USA). pcDNA3-HA-FOXM1 was a gift from Dr. RH Medema (University
 Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands), the pGL2-promoter 3xIRS firefly
 luciferase reporter was kindly provided by Dr. DJ Tindall (Mayo Clinic college of
 Medicine, Rochester, MN, USA).

Cell culture

U2-OS cell line, normal human diploid fibroblasts IMR90 and BJ were purchased at ATCC and were cultured in Dubelco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO) , 1% penicillin G/streptomycin sulfate (GIBCO) and 2 mM L-glutamine (GIBCO). Human diploid fibroblast expressing the ecotropic receptor, designated I^e and BJ^e, were generated as described below and cultured in the above mentioned media.

Retroviral-mediated gene transfer

Either amphotropic or ecotropic Phoenix packaging cells were plated at a density of 5×10^6 cells in a 10 cm dish (Corning) 24h prior to transfection. Cells were transfected with 20 μg of the indicated plasmid by the calcium phosphate precipitation method. Sodium butyrate was added to a final concentration of 10 mM 24h after transfection and incubated for 12h. Fresh medium was added and 12h later, the virus-containing medium was filtered (first soup) (0,45 μm ; Millipore) and supplemented with polybrene (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; SIGMA) and 10% FBS. Viruses were collected for an additional 12h as before (second soup). Fibroblasts were plated at a density of 8×10^5 cells in a 10 cm dish and incubated overnight. For infections, the culture medium was replaced with the first virus-containing soup and incubated at 37°C for 12h. The infection was repeated with the second soup. After the infection, fresh medium was added and cells were incubated to recover for 24h before selection was performed to eliminate uninfected cells. Puromycin (GIBCO) and G418/geneticin (Bioshop) were used at a concentration of 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 days and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 7 days, respectively.

Growth curve

Two days after selection, infected fibroblasts were plated (2×10^4 /well) in 12 well plates. At the indicated times, cells were washed once with 1X PBS and fixed for 15 min at room temperature (RT) in 1% glutaraldehyde (SIGMA). Cells were washed twice with 1X PBS and stained for 30 min at RT on a shaker with a 0,1% crystal violet (Fisher) solution. Cells were washed extensively in water, dried and (destained) with 1 mL of 10% acetic acid solution. Aliquots were diluted 1/10, if necessary, in the acetic acid solution and 100 μL of each sample were transferred to a 96-well microtiter plate and the optical density at 590 nm was measured. Values were normalized to the optical density at day 0 for the appropriate cell type. Each time point was measured in triplicate.

Colony Assay

U2-OS cells were plated at a density of 5×10^5 per 10 cm dish and incubated overnight at 37°C. Cells were transfected using the calcium-phosphate precipitation method with 15 µg of the indicated plasmid constructs. Fresh medium supplemented with 2,5 µg/mL of puromycin was added 48h after transfection and cells were kept in selection for 7 days until formation of colonies. Afterwards, cells were fixed and stained as described for the growth curve protocol.

Senescence-associated β-galactosidase assay

At the indicated time point, cells were washed once in 1X PBS pH7,4 and fixed for 10 min at RT with a 0,5% glutaraldehyde solution. Cells were washed twice with 1X PBS pH 6,0 supplemented with 1mM MgCl₂ and stained at 37°C with the X-gal solution (1 mg/mL X-Gal (Bioshop), 0.12 mM K₃Fe[CN]₆, 0.12 mM K₄Fe[CN]₆ (SIGMA) in 1X PBS pH 6,0 supplemented with 1 mM MgCl₂)

Western blots

To prepare total cell extracts, cells were collected by trypsinization, washed with 1X PBS, lysed in 100 µL of SDS sample buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol) and boiled for 5 min. For immunoblotting, 20 µg of total cell proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). The following primary antibodies were used : anti-Flag M2 mouse monoclonal (1 :10 000, SIGMA), anti-Rb (G3-245, 1:1000, BD biosciences), anti-α-tubulin (B-5-1-2, 1 :5000, SIGMA), anti-FOXN3 (1 :1000, CeMines, CO, USA), anti-CHES1 (1:1000, Aviva Systems Biology, CA, USA), anti-GFP (1:1000 , Roche) and anti-phospho(Ser/Thr)ATM/ATR substrate (1:1000, Cell signaling). Signals were revealed after

incubation with anti-mouse (1:1500) and anti-rabbit (1:1500) secondary antibodies coupled to peroxidase (Amersham, UK) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK) or Lumi-Light^{PLUS} (Roche).

RNA analysis isolation, RT-PCR, real-time PCR

For Ras and STAT5 expressing cells, RNA was isolated 8 days after infection (6 days after selection) with the Ultraspec RNA isolation kit (Biotecx laboratories, TX, USA) according to manufacturer's instructions. Then, total RNA was passed through RNeasy purification kit (QIAGEN) to get rid of contaminating tRNA. Rat tissues were provided by Dre. Pierrette Gaudreau and animals were housed as previously described (Girard N, 1998)(Technopole Angus, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center, Montréal, Qc). RNA from Rat liver was processed through the same steps, except that tissues were homogenized by passing them through 20G needles for at least 10 times before proceeding with the Ultraspec protocol. For real time RT-PCR or semi-quantitative RT-PCR, 2-5 µg of total RNA were reverse transcribed with RevertAidTM H minus First Strand Synthesis kit (Fermantas) using oligo dT primers and the resulting first strand cDNA was used as template for PCR. Primers used for hCHES1 are sense : 5'GATCGAATTCGCCATGGGTCCAGTCATGCCTCCC 3' and anti-sense : 5'TCGACTCGAGTTAATTTTTGTGGTTTCCTTTTGC 3' for hGAPDH: sense 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3', anti-sense 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTAG3'. Rat CHES1 : sense 5'GGCTTTGAAAAAGACACCGTA3' and anti-sense 5'AGATGGGTGGACCTGATGTG3'. Rat p16 sense 5'GGGCTTCCTAGACACTCTGGT3' and anti-sense 5'GTGATGTCCCCGCTCTAGG3'.

Microarray analysis

RNA was collected 24h after selection (3 days post-infection) from IMR90 cells infected with pLPC-Flag CHES1L or an empty vector and processed as described above. tRNA-free samples were sent to Genome Quebec facility at McGill University for cRNA amplification and subsequent hybridization on HG-U133_Plus_2 Affimetrix DNA Chip. Data were analyzed using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) web-based tool from *gene ontology*: www.geneontology.org.

Luciferase assay

U2-OS cells were seeded at 1×10^5 cells per well in a 6-well plate and incubated overnight. Cells were transfected using Fugene 6 reagents with $1 \mu\text{g}$ of the firefly luciferase reporter plasmid bearing three repeats of the forkhead binding site (3XIRS), $0,25 \mu\text{g}$ of the *Renilla* luciferase reporter plasmid under the control of the β -globin promoter, $1 \mu\text{g}$ of pcDNA3-HA-FOXM1 or pLPC-Flag CHES1L expressing plasmid and in a 1:2 ratio (CHES1 over FOXM1) when co-expressed. The total amount of plasmid was kept constant by adding the empty vector pLPC. Cells were harvested 48h after transfection and processed for Dual-Luciferase assay (Promega) according to manufacturer's instructions.

Fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy, 2×10^5 cells were plated on coverslips in 6-well plates (Costar, Corning Inc., NY, USA). At 24 h after plating, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at RT. Then, the cells were washed in 1X PBS and permeabilized using ice-cold 0,2% Triton X-100 in PBS/BSA 3% solution for 5 min. Then, cells were washed three times with PBS/BSA and incubated for 1h at room temperature with the anti-Flag M2 mouse monoclonal antibody (1:200). The cells were washed and

incubated for 1h with Alexa-488 conjugated secondary antibody (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Finally, the cells were washed three times with 1X PBS , incubated in 300nM DAPI for 10 min and mounted on microscope slides. Images were obtained using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope and the software MetaMorph (Universal Imaging Corp.). The figures were composed with Adobe Photoshop 6.0 and Canvas 8.

Acknowledgements

We thank members of the Ferbeyre laboratory for helpful comments and technical assistance. Drs P. Gaudreau, L. Desgroseillers, RH Medema and TJ Tindall for rat tissues, anti-GFP, FOXM1 construct and 3XIRS luciferase reporter, respectively. This work was supported by CIHR to G.F. and a fellowship from Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to L.D.

REFERENCES

1. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., & Jackson, S. P. (2003) *Nature* **426**, 194-198.
2. Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., *et al.* (2006) *Nature* **444**, 633-637.
3. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., *et al.* (2006) *Nature* **444**, 638-642.
4. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F., & Ferbeyre, G. (2007) *Genes Dev* **21**, 43-48.
5. Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004) *Nat Cell Biol* **6**, 168-170.
6. Herbig, U., Ferreira, M., Condell, L., Carey, D., & Sedivy, J. M. (2006) *Science* **311**, 1257.
7. Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, G. P. (2004) *Biogerontology* **5**, 1-10.
8. Dolle, M. E., Giese, H., Hopkins, C. L., Martus, H. J., Hausdorff, J. M., & Vijg, J. (1997) *Nat Genet* **17**, 431-434.
9. Dolle, M. E., Snyder, W. K., Gossen, J. A., Lohman, P. H., & Vijg, J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8403-8408.
10. Seluanov, A., Mittelman, D., Pereira-Smith, O. M., Wilson, J. H., & Gorbunova, V. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7624-7629.
11. Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005) *Cell* **120**, 483-495.
12. Ferbeyre, G. & Lowe, S. W. (2002) *Nature* **415**, 26-27.

13. Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., & Alt, F. W. (2005) *Cell* **120**, 497-512.
14. Campisi, J. (2005) *Cell* **120**, 513-522.
15. Bartke, A. (2003) *Neuroendocrinology* **78**, 210-216.
16. Pendergrass, W. R., Li, Y., Jiang, D., & Wolf, N. S. (1993) *J Cell Physiol* **156**, 96-103.
17. Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Levesque, I., Varin, A., & Herbein, G. (2006) *Mech Ageing Dev* **127**, 526-537.
18. Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A. L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., & Kitamura, T. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 3871-3879.
19. Pati, D., Keller, C., Groudine, M., & Plon, S. E. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 3037-3046.
20. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., & Lowe, S. W. (2000) *Genes Dev* **14**, 2015-2027.
21. Cokol, M., Nair, R., & Rost, B. (2000) *EMBO reports* **1**, 411-415.
22. Scott, K. L. & Plon, S. E. (2005) *Gene* **359**, 119-126.
23. Luscher-Firzlauff, J. M., Westendorf, J. M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., Muller, R., Pirollet, F., & Luscher, B. (1999) *Oncogene* **18**, 5620-5630.
24. Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P., & Doxsey, S. (2007) *Nat Cell Biol* **9**, 160-170.
25. Ly, D. H., Lockhart, D. J., Lerner, R. A., & Schultz, P. G. (2000) *Science* **287**, 2486-2492.

Figures and Legends

Figure 1. CHES1 is up-regulated in oncogene-induced senescence and ageing. **A)** Semi-quantitative RT-PCR of IMR90 cells with a control vector (V), oncogenic *ras* (R) or STAT5A1*6 (5A). **B)** Western blot analysis of CHES1 expression in IMR90 cells bearing a control vector (V), oncogenic *ras* (R) or STAT5A1*6 (5A). **C)** Real-time PCR analysis from rat liver RNA for CHES1 expression in old and young *ad libitum* and old calorie restricted-fed rats. p16^{INK4a} serves as a positive control. n=3, * p < 0,05, ** p < 0,15.

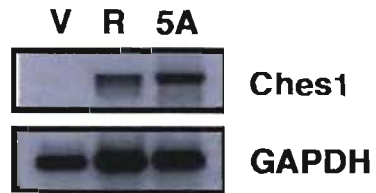
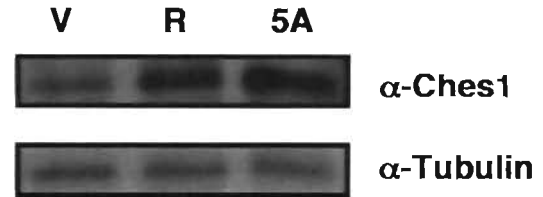
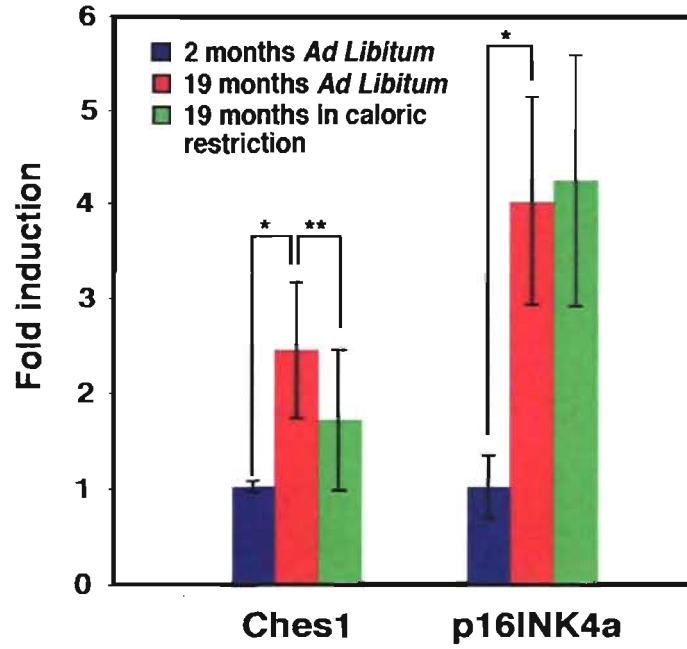
A**B****C**

Figure 2. CHES1 is a negative regulator of cell growth. **A)** Growth curve analysis of BJ^c cells infected with a control vector (pLPC), CHES1L, CHES1S or STAT5A1*6. **B)** SA- β -gal staining at day 1 and 8 after selection of the above mentioned cells. **C)** Time course analysis of SA- β -gal positive cells from panel B. **D)** Colony formation assay with U2OS cells transiently transfected with a control vector (pLPC), CHES1L or CHES1S.

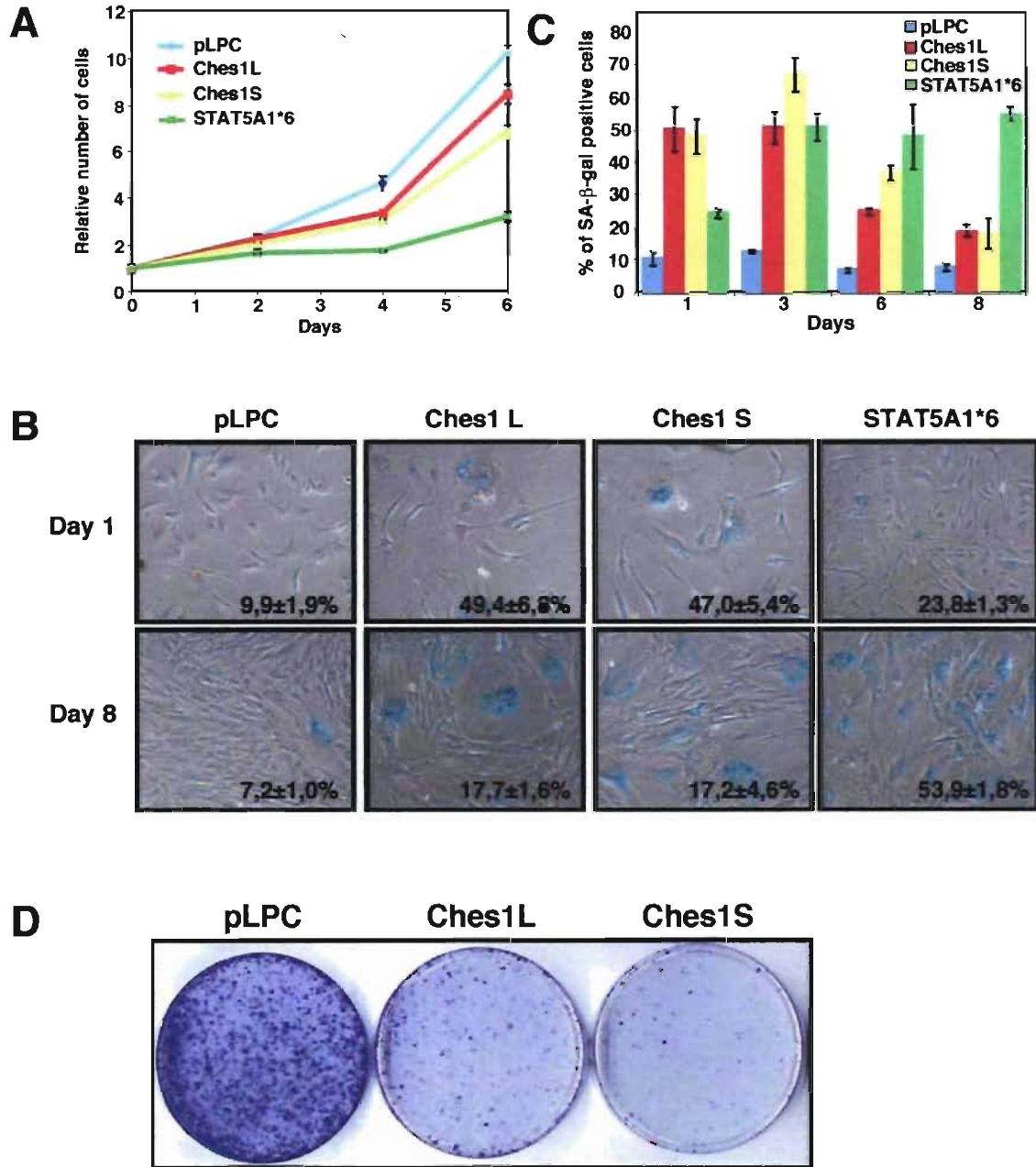
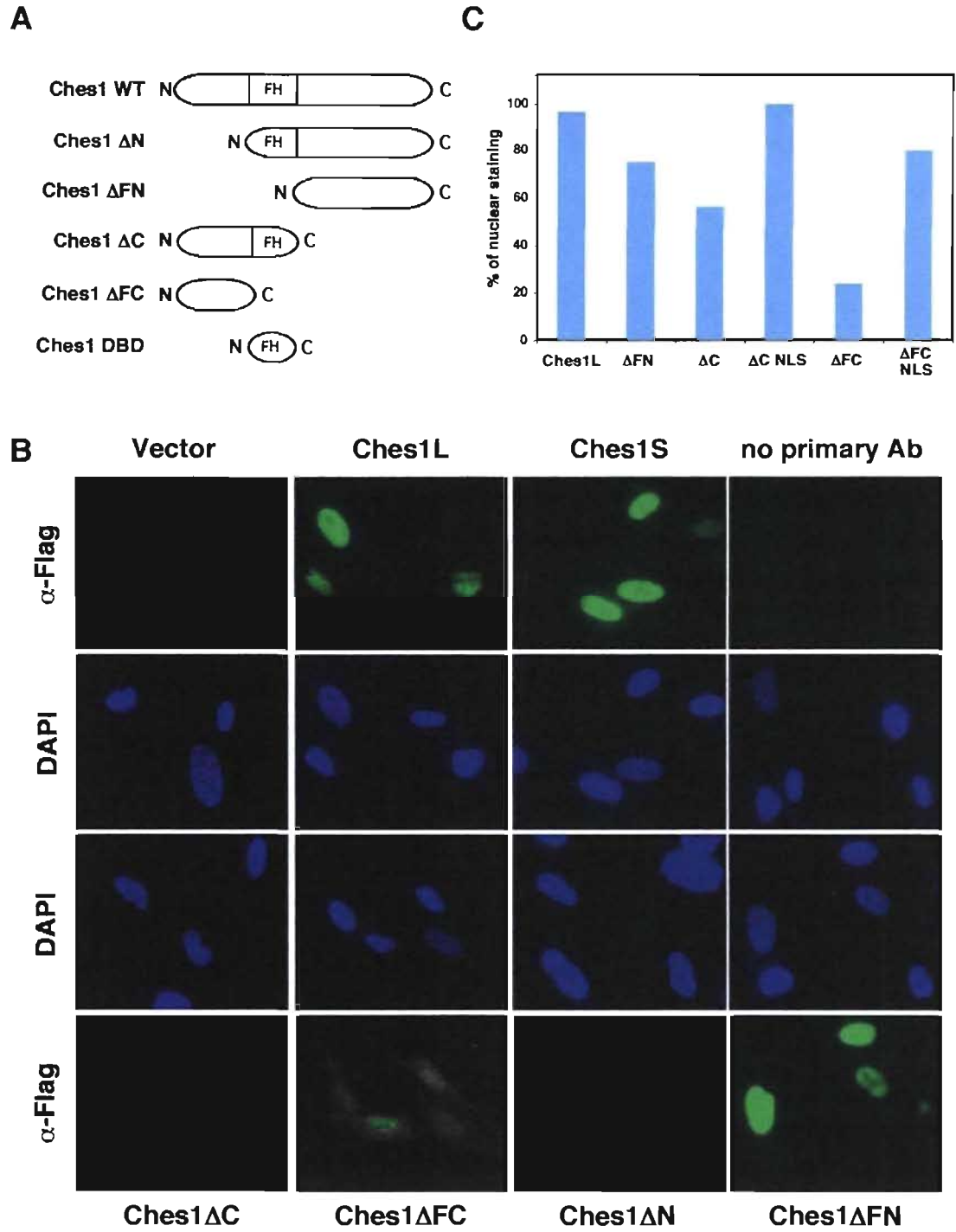


Figure 3. CHES1 DBD is sufficient to block cell proliferation. **A)** Schematic representation of CHES1L and its derived deletion mutants. The forkhead DNA-binding domain encompasses amino acid 110 to 205 and the C-terminal NLS is located to amino acid 418-445 as determined by the Predict NLS software (217). The Δ FC and Δ C mutants have also been added the SV40 NLS, termed Δ C-NLS and Δ FC-NLS, but are not represented here. The DBD mutant also contains the SV40 NLS. **B)** Immunofluorescence at day 1 of I^c cells infected with the indicated mutants. **C)** Quantification of nuclear staining of I^c cells infected with the different mutants. A minimum of 50 positive cells was counted. **D)** Western blot analysis of U2OS cells transfected as in A) plus 5 μ g of pBabe-GFP to measure the expression levels of each mutants. **E)** Colony formation assay in U2OS cells transiently transfected with 15 μ g of empty vector (V), CHES1L, and its derived mutants : Δ N, Δ FN, Δ C, Δ FC, Δ C-NLS, Δ FC-NLS and DBD. **F)** Quantification of data presented in **E**).



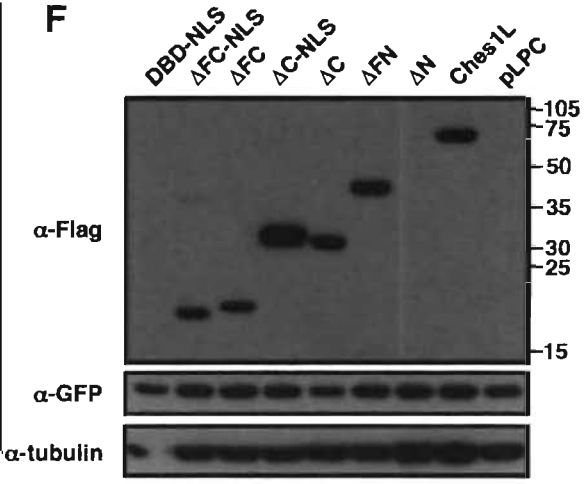
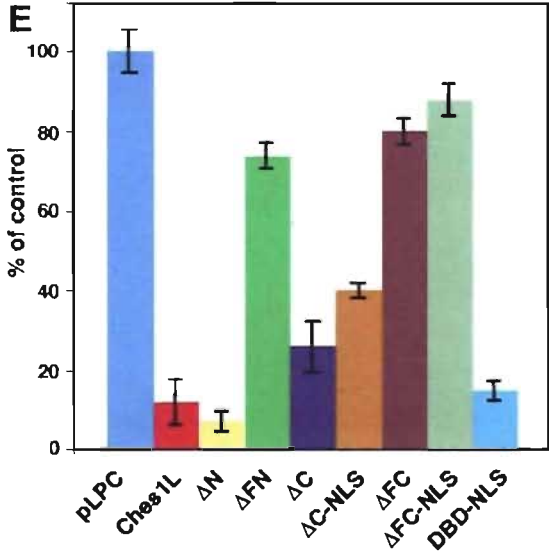
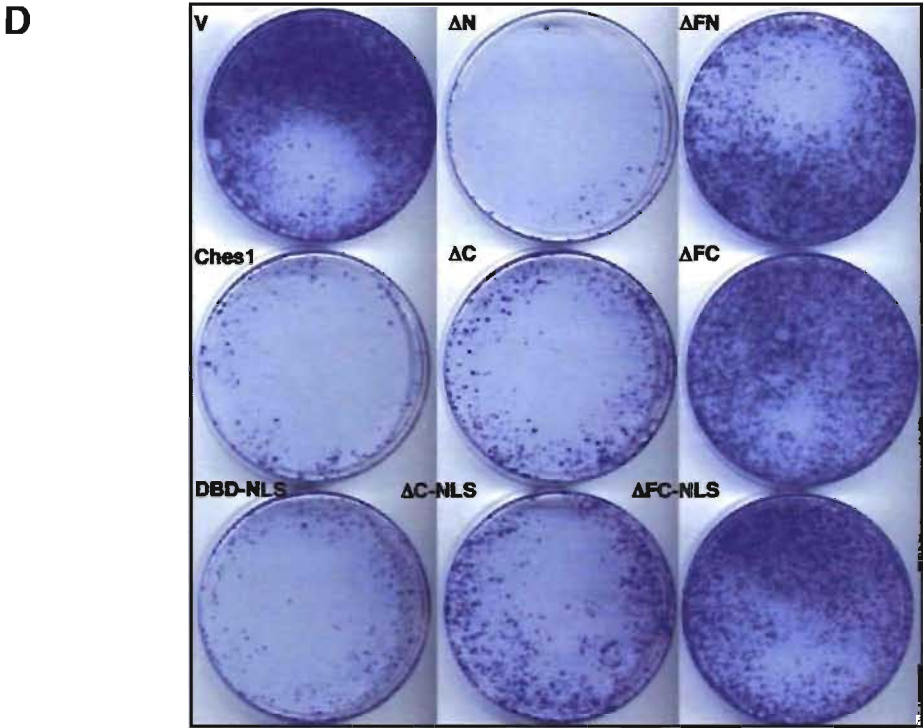


Figure 4. CHES1 inhibits FOXM1-dependent transactivation. **A)** Dual-luciferase assay in U2OS cells transiently transfected with the pGL2-3XIRS firefly luciferase plasmid, the β -globin promoter *renilla* luciferase plasmid and the indicated vectors. Asterisk represents a significant decrease of luciferase activity ($p < 0.01$) compared to cells expressing FOXM1 alone. **B)** Dual-luciferase assay in U2OS cells transiently transfected with the β -casein promoter firefly luciferase plasmid, the β -globin promoter *renilla* luciferase plasmid and the indicated vectors. **C)** SA- β -gal staining at day 6 post-selection of I^e cells bearing the empty vector LXS_N or its derivative expressing E6, E7 or E6/E7 in combination with the empty vector pLPC or the CHES1 Δ N mutant. **D)** Models of action of CHES1-induced senescence. CHES1 induces senescence by down-regulating FOXM1 levels and its target genes, either directly or indirectly.

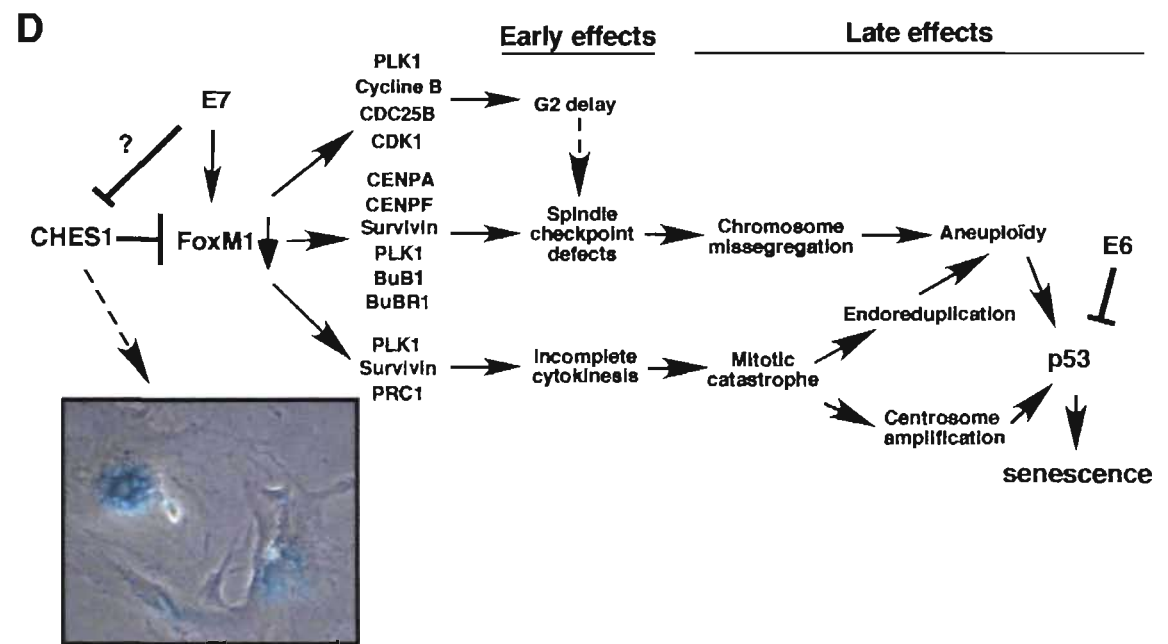
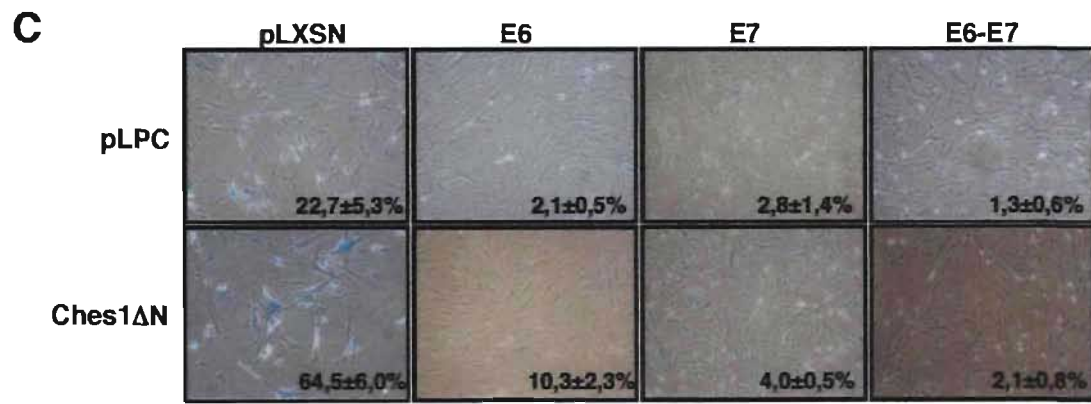
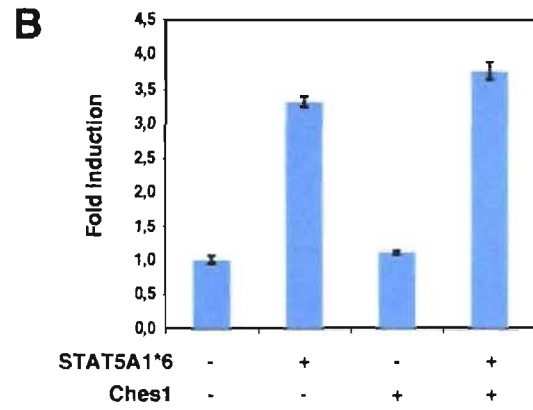
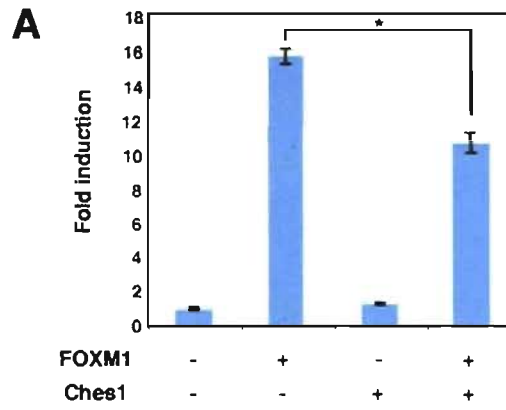


Table I. CHES1 represses G₂/M specific genes. Microarrays analysis at day 1 after selection of I^c cells infected with CHES1ΔN compared to control cells infected with an empty vector. Asterisks represent genes similarly regulated in skin tissues originating from aged compared to young human as described in (25)

Functional annotation	Gene	Name	Fold change
<i>Mitotic Cell cycle</i>	GAS7	Growth arrest-specific 7	-21.9
	CCNB2*	Cyclin B2	-5.0
	CCNA2*	Cyclin A2	-4.7
	CDC2	Cyclin-dependant kinase 1 (CDK1)	-3.6
	FOXM1*	forkhead box M1	-2.9
	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57 Kip2)	+3.8
	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	-5.8
	BIRC5*	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-3.2
<i>Spindle checkpoint</i>	BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1	-11.7
	MAD2L1	mitotic arrest deficient-like 1	-4.0
	BUB1B (BUBR1)**	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	-4.0
	ANAPC5	anaphase-promoting complex subunit 5	-2.9
	ANAPC7	anaphase-promoting complex subunit 7	-3.4
	CDC20*	CDC20 cell division cycle 20 homolog	-3.4
<i>Centromere and Chromosomal integrity</i>	CENPF*	centromere protein F 350/400ka (mitosin)	-2.9
	CENPA*	centromere protein A 17kDa	-4.6
	CENPH	centromere protein H	-3.1
	H2AX*	H2A histone family member X	-3.9
	PSEN1*	presenilin 1 (Alzheimer disease 3)	-2.7
	TMPO	thymopoietin	-2.9
	HMGB2*	high-mobility group box 2	-3.2
	BRRN1	barren homolog (Drosophila)	-22.3
<i>Others</i>	RANBP1*	RAN binding protein 1	-9.6
	KIF2C*	kinesin family member 2C	-4.6
	MCL1*	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	-3.7

Discussion

5.1. CHES1 en tant que suppresseur tumoral

Nos travaux ont su démontrer que CHES1 était un gène de suppression tumorale. Son induction spécifique, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, lors de la sénescence oncogénique illustre bien que la protéine a un rôle à jouer dans ce phénomène, qu'il soit primordial ou accessoire. Cependant, tout porte à croire qu'il est important puisque la surexpression de CHES1 par elle-même est suffisante pour instaurer le programme de sénescence. Cependant, seule l'inactivation du gène de CHES1 durant la sénescence oncogénique nous permettra d'identifier son rôle dans ce processus. Toutefois, il serait surprenant que l'inactivation seule de CHES1 empêche l'entrée en sénescence par les oncogènes puisqu'il est bien connu que les fibroblastes normaux humains requièrent seulement une seule des deux grandes voies de suppression tumorale (20, 37). Une stratégie inactivant simultanément CHES1 en combinaison avec Rb ou p53 nous permettrait de déterminer l'importance de CHES1 tant dans l'entrée en sénescence que dans le maintien du phénotype.

Nous avons constaté que l'efficacité de CHES1 à induire la sénescence est moindre que celle d'un oncogène. De fait, la proportion de cellules sénescents infectées avec CHES1 diminue avec le temps contrairement aux cellules infectées par un oncogène où elle reste stable après avoir atteint un maximum. Ce résultat, bien que surprenant, est conforme à l'action d'un suppresseur tumoral. En effet, p53, qui contrôle directement la sénescence induite par les oncogènes, n'induit pas la sénescence lorsqu'il est surexprimé dans les fibroblastes, mais induit plutôt un arrêt de croissance transitoire (36, 196). Ainsi, tout comme p53, CHES1 pourrait induire un arrêt de croissance rapide et d'une courte durée avant que les cellules poursuivent leur division. Cette hypothèse est plus que probable

puisque un rôle dans le contrôle du point de restriction en G₂ lui avait précédemment été attribué (188).

Que ce soit un arrêt de croissance ou la sénescence, l'effet induit par CHES1 semble être régulé par son activité et ses niveaux d'expression. Ainsi, lorsque l'activité et les niveaux d'expression sont élevés le programme de sénescence est engagé tandis que lorsqu'ils sont faibles un bref arrêt de croissance serait préconisé. Quelques évidences expérimentales appuient cette hypothèse. D'une part, l'activité de CHES1 est régulée par phosphorylation (voir section 5.2.4.2). D'autre part, CHES1 est une protéine avec une courte durée de vie. De fait, l'inhibition du protéasome, à l'aide de l'agent pharmacologique MG132, augmente significativement les niveaux de CHES1 tout comme ceux de p53, qui est connu pour avoir une courte demie-vie, suggérant ainsi que Ches1 est rapidement dégradé (figure 7A). Cette affirmation est confirmée par la présence de formes ubiquitinées de la protéine après immunoprécipitation en présence du MG132 tandis que ces formes sont absentes lorsque le protéasome est actif (figure 7B, panneau du haut). Des bandes de haut poids moléculaire spécifique à CHES1 sont observables, suite à l'immunoprécipitation dans les mêmes conditions, ce qui suggère fortement que ces formes représentent les formes ubiquitinées (figure 7B, panneau du bas). De plus, le programme de prédiction de motifs protéiques ELM (Eukaryotic Linear Motif resource) prédit un site de liaison potentiel à Cdc20/Cdh1 suggérant ainsi que CHES1 serait ubiquitiné par le complexe APC/C (voir figure 12) (197). En effet, ces protéines reconnaissent les substrats du complexe et fait le pont entre les protéines à dégrader et les ubiquitines ligases. Cette possibilité est d'autant plus attrayante puisque ce complexe est responsable de la progression vers l'anaphase (198). Ainsi, la dégradation de CHES1 serait associée à la progression dans le cycle cellulaire et à la sortie de la mitose.

Le potentiel anti-tumoral de CHES1 n'est pas seulement reflété dans sa capacité d'induire la sénescence dans les cellules normales, mais aussi dans celle de réduire la croissance d'une lignée cellulaire de tumeurs. Le rôle de CHES1 en tant que suppresseur

tumoral est d'autant plus confirmé dans ce contexte. En effet, plusieurs études d'expression génique comparative montrent que l'expression de CHES1 se retrouve diminuée dans plusieurs types de lignées cancéreuses. De plus, certains types de cancers pourraient être associés à la perte du gène de CHES1 (199, 200). Le tableau III dresse un bilan des études qui ont identifié différents cancers dans lesquels l'expression de CHES1 est dérégulée. Par surcroît, les mutations autosomales dominantes dans le gène de MEN1, générant une protéine tronquée dans la portion carboxy-terminale interagissant avec CHES1, sont associées à une incidence accrue de cancers affectant principalement les organes endocrines (voir section 3.7)(201).

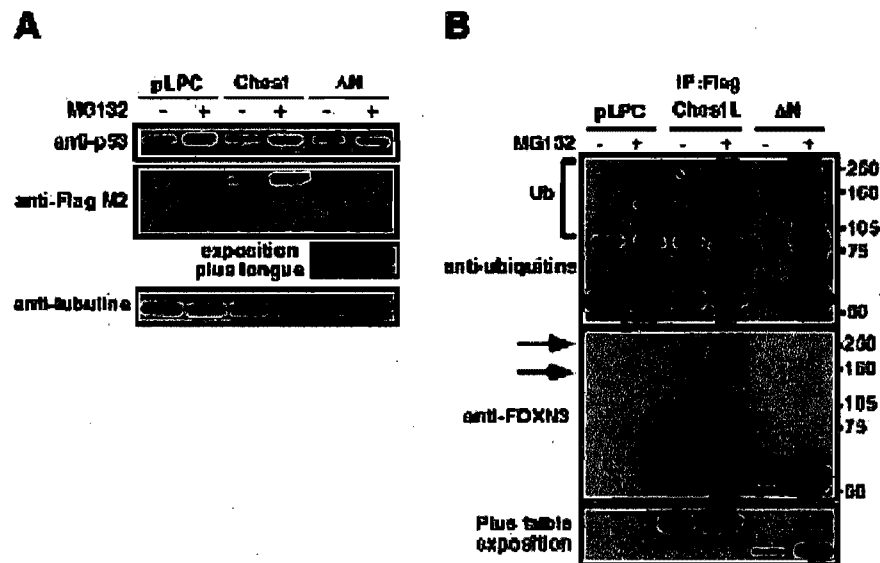


Figure 7. Ches1 est rapidement dégradé par le protéasome.

A) Analyse par immunobuvardage des niveaux d'expressions de Flag-CHES1L et du mutant Flag-ΔN en présence et en absence de l'inhibiteur du protéasome, MG132, à une concentration de 80 μ M pendant 5h. B) Analyse par immunobuvardage de l'état d'ubiquitination de CHES1L et du mutant ΔN, préalablement immunoprécipités avec un anticorps anti-Flag, provenant de cellules traitées comme en A).

Tableau III. Expression différentielle de CHES1 dans les différents types de cancers

Types de maladies	Expression	Références
Cancer de la peau (BCC)	Diminué 2,03 fois comparativement à des tissus de peau non cancéreuse	(202)
Cancer de la bouche (OSCC)	Diminué 15 fois comparativement aux tissus normaux dans une fréquence de 46%	(203)
Cancer de l'épithélium des ovaires	Diminué 4,3 fois comparativement aux ovaires normaux	(204)
Mésothéliomes malins	Délétion fréquente (43%) des régions q11.2-13.2, q22.3-24.3 et q32.12*	(199, 200)
Métastases provenant de cancer de la prostate résistant aux androgènes	Diminué en moyenne 2,1 fois comparativement aux tumeurs primaires	(205)
Adénocarcinome gastrique	Diminué en moyenne 4,1 fois comparativement à l'épithélium gastrique normal	(206)
Lignée cellulaire colorectale et cancer colorectal	CHES1 est une cible prédite de miR-92 et miR-182 qui sont augmenté 3,86 et 1,77 fois dans les lignées cellulaire de cancers colorectaux	(207)
Sarcome du rein (CCSK)	Délétion du chromosome 14q24.1-q31.1	(208)
Carcinome du rein (cRCC)	Diminué ; Expression présente dans 14% des tissus rénaux cancéreux comparativement aux tissus normaux (60%) Région 14q31-q32.2 associé à forte malignité et une faible survie	(209) (210)
Lymphome des cellules B	Diminué 3,1 et 1,4 fois dans les lymphomes sporadique et les lymphomes accéléré par Ras provenant de souris Brd2 transgéniques, respectivement.	(211)

De plus, une analyse protéomique a démontré que les niveaux de la protéine de CHES1 étaient augmentés durant l'apoptose d'une lignée cellulaire de mélanome humain induite par l'agent anti-métastatique, MMTC (212). Ainsi, les effets observés par la surexpression de CHES1 combinés aux données retrouvées dans la littérature démontrent bien que CHES1 possède toutes les caractéristiques d'un gène de suppression tumoral.

5.2. Les domaines fonctionnels de CHES1

Une grande partie des travaux a été consacrée à l'analyse fonctionnelle des portions de la molécule qui sont importantes pour freiner la croissance cellulaire. Pour ce faire, nous avons généré plusieurs mutants de délétion et leur analyse nous a permis d'identifier trois domaines ou motifs fonctionnels importants pour l'activité de CHES1 :

1. Le domaine de liaison à l'ADN
2. Les signaux de localisation nucléaire
3. Le domaine N-terminal

Cependant, avant même de débiter l'analyse des mutants il nous était possible d'identifier une courte région de 22 acides aminés qui semblait influencer l'activité de CHES1. Il nous a été possible de cloner 2 isoformes différents de CHES1 à partir de l'ARN des cellules sénescents par l'oncogène STAT5A1*6, que l'on a nommé CHES1L (isoforme long) et CHES1s (isoforme court).

5.2.1. Efficacité différentiel des deux isoformes

Nos résultats semblent indiquer que l'isoforme court est quelque peu plus efficace que l'isoforme long à induire l'arrêt de croissance. Toutefois, l'attribution d'une fonction à cette courte région ne peut être basée sur les études publiées d'autres protéines connues puisqu'aucune autre protéine eucaryote possédant une similarité de séquence acceptable avec cette région n'a pu être identifiée (BLAST). Cependant, un rôle potentiel pour cette région a pu être identifié à l'aide du programme de bio-informatique de prédiction de

domaines et motifs protéiques ELM (Eukaryotic linear motif resource) (197). Ce programme prédit un domaine d'interaction protéique WW de type 4 dans cette courte région. Ces domaines sont connus pour reconnaître et lier de courte séquence riche en proline de façon phosphosérine dépendante (213). Ils ont de plus été associés à la régulation de la mitose et à la dégradation des protéines de façon dépendante de l'ubiquitine (214), deux aspects biochimiques associés à CHES1.

Ainsi, en supposant que cette courte région soit impliquée dans le processus de dégradation via l'ubiquitine, CHES1s serait possiblement moins facilement dégradé que l'isoforme long ce qui permettrait à l'isoforme court d'agir plus longtemps d'où l'efficacité accrue de réduire la croissance cellulaire.

5.2.2. Le domaine de liaison à l'ADN

L'analyse des mutants de délétion nous a permis de déterminer que le domaine de liaison à l'ADN était indispensable pour réduire la croissance de la lignée cellulaire U2OS puisque chaque mutant ne possédant pas ce domaine ne pouvait diminuer la formation de colonies de cette lignée cellulaire. Nos résultats sont en désaccord avec la première étude portée sur CHES1 qui démontrait que le domaine de liaison à l'ADN n'était pas nécessaire pour restaurer le point de restriction en G₂/M déficient dans une souche de levure puisque seul le domaine carboxy-terminal était suffisant (188). Tout d'abord, la différence du système utilisé peut expliquer la divergence des résultats obtenus. En effet, alors que notre étude a été effectuée dans les cellules humaines, celle de Pati et al a été effectuée dans les levures. Qui plus est, cet organisme ne possède pas d'orthologue de CHES1. Cependant, nous ne pouvons écarter la possibilité que CHES1 ait un rôle indépendant du domaine de liaison à l'ADN et de la transcription tel qu'il a été démontré pour FOXO1 (140).

Nous avons aussi pu déterminer que le domaine de liaison à l'ADN était suffisant pour réduire la formation de colonies. Puisqu'il a été décrit que CHES1 est un répresseur transcriptionnel (191), ce résultat nous permettait d'établir deux modèles d'actions

possibles. Premièrement, CHES1 compétitionnerait pour des sites de liaison à l'ADN dans les promoteurs des gènes qu'il régule de façon à empêcher la liaison de l'activateur transcriptionnel, que l'on croit être FOXM1, à ces mêmes promoteurs (voir section 5.3.2.).

Deuxièmement, il agirait en tant que trans-répresseur en liant directement l'activateur transcriptionnel via son DBD de façon à l'empêcher d'activer la transcription. Cependant, cette dernière hypothèse est moins probable puisqu'aucune interaction entre CHES1 et FOXM1 n'a été détectée dans nos expériences (LD, résultat non publié). Cependant, dans notre système, CHES1 ne semble pas avoir d'activité répressive intrinsèque puisqu'il est incapable de réprimer l'expression génique par essai luciférase contrairement à l'étude initiale démontrant que le domaine carboxy-terminal de CHES1 possède une activité répressive indépendante du DBD (191). De plus, le domaine carboxy-terminal n'est pas nécessaire pour réduire la formation de colonies et l'induction de sénescence dans notre étude. Les résultats obtenus par Scott et al. pourraient s'expliquer par le fait qu'ils n'ont utilisé que le domaine carboxy-terminal en fusion à Gal4. En effet, il arrive parfois qu'en étudiant les propriétés transcriptionnelles d'une protéine à l'aide d'une protéine de fusion que ses propriétés soient altérées, tel qu'il a été décrit pour PML (215). Malgré tout, il semble que ce mode d'action soit conservé parmi les facteurs forkheads puisque FoxD3, un autre répresseur transcriptionnel, requiert uniquement son domaine Forkhead (216). Ainsi, nos résultats préconisent un modèle de répression par compétition.

5.2.3. Les signaux de localisation nucléaire (SLN)

L'analyse de la localisation cellulaire des différents mutants nous a permis de déterminer que la protéine contenait deux SLNs fonctionnels. Dans un premier temps, nous avons pu confirmer la présence d'un SLN dans la portion carboxy-terminal tel qu'il était prédit par le programme Predict NLS (217). Ce SLN semble être le principal acteur de la localisation nucléaire de la protéine puisque son ablation diminue grandement le pourcentage de cellules ayant un signal nucléaire. L'autre SLN est présent dans le domaine

forkhead et est conservé dans plusieurs autres facteurs forkheads (79). Cependant, CHES1 ne possède qu'une seule des deux tyrosines importantes pour la translocation nucléaire bien que le rôle individuel de chacune de ces 2 tyrosines n'ait pas été testé. Il est donc possible que la tyrosine en position 6 (voir figure 6) ne soit pas nécessaire et que ce motif soit impliqué dans la localisation nucléaire de CHES1. Nos résultats semblent être en accord avec cette hypothèse puisque l'ablation du domaine forkhead diminue la translocation nucléaire des différents mutants, quoique dans une proportion moindre que le SLN en carboxy-terminal. Ultiment, l'impact de chaque SLN potentiel devra être testé en protéine de fusion à la GFP pour corroborer les études d'immunofluorescence. Ainsi, nos résultats sont en accord avec la plupart des études sur les forkheads qui ont démontré que ces facteurs de transcription possèdent plus d'un SLN (voir section 3.1.3.).

5.2.4. Le domaine N-terminal

5.2.4.1. Un domaine inhibiteur

À première vue, le domaine amino-terminal ne semble pas être important pour les fonctions de la protéine puisqu'il ne possède pas de domaines ou motifs protéiques conservés. Malgré tout, il semble être très important pour les fonctions de FOXN1, un membre de la même sous-famille et apparenté à CHES1 (180). Nos études ont su démontrer que ce domaine est tout aussi important pour la régulation de l'activité de CHES1 puisqu'il semble agir comme un domaine inhibiteur. En effet, le mutant ΔN est hyperactif puisqu'il est aussi sinon plus efficace que la protéine sauvage pour réduire la formation de colonies et pour induire la sénescence. De plus, le mutant ΔN est plus efficace pour stabiliser p53. De fait, lorsque les cellules sont en présence de Ches1, l'ubiquitination de p53 diminue drastiquement et cet effet est d'autant plus remarquable en présence du mutant ΔN (figure 8). La diminution de l'ubiquitination de p53 se traduit par une augmentation de sa stabilité qui mène habituellement à une activation de la protéine. Ainsi, cette observation soutient le résultat obtenu dans les fibroblastes démontrant que l'effet de CHES1 est dépendant de

p53. De plus, il a bien été démontré, dans le cas du récepteur de l'acide rétinoïque, que les cellules peuvent répondre à un signal excessif en augmentant le taux de dégradation du facteur en cause (218). Or, la figure 7B démontre que le niveau d'ubiquitination du mutant ΔN est de beaucoup supérieur à celui de la protéine sauvage bien que les niveaux d'expression de ce dernier soient supérieurs à ceux du mutant ΔN . Donc, plusieurs évidences expérimentales soutiennent un rôle inhibiteur pour ce domaine.

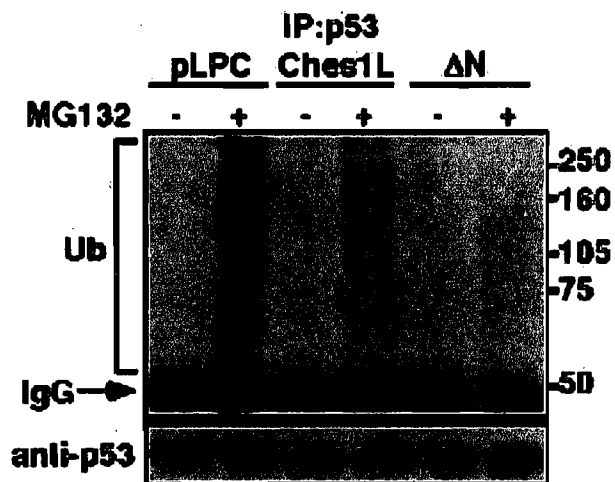


Figure 8. Ches1 stabilise p53.

Analyse par immunobuvardage de l'état d'ubiquitination de p53 à l'aide d'un anticorps spécifique à l'ubiquitine. La protéine p53 a été immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps anti-p53 #9282 dans les cellules U2OS traitées ou non au MG132, préalablement transfectées avec un vecteur vide, CHES1L ou le mutant ΔN . Les quantités de p53 immunoprécipitées ont été mesurées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-p53 (1C12).

Malgré tout, le fait le plus remarquable de la délétion du domaine amino-terminal est sa perte d'expression. Mais pourquoi au juste ce mutant ne s'exprime pratiquement pas ? L'explication la plus attrayante vient du fait que le mutant ΔN est beaucoup plus ubiquitiné que la protéine sauvage (figure 7B) et donc qu'il serait rapidement dégradé à un point tel qu'on ne pourrait le détecter. Cependant, bien que l'on considère que le mutant ΔN soit plus dégradé que la protéine sauvage, on s'attendrait à ce que les niveaux du mutant

ΔN soient pratiquement les mêmes que ceux de CHES1 en présence de MG132. Or, ce n'est pas le cas (figure 7A) et donc, d'autres facteurs doivent contribuer à ce phénomène.

Dans le but de raffiner la région du domaine amino-terminal qui pouvait être responsable de cet effet, nous avons généré trois nouveaux mutants desquels 26 acides aminés ont successivement été éliminés. Ainsi, le mutant $\Delta N26$ manquait les 26 premiers acides aminés, le $\Delta N52$ manquait les 52 premiers et ainsi de suite. Nous avons ensuite vérifié les niveaux d'expression de chacun de ces mutants. La figure 9A montre que l'expression des mutants $\Delta N26$ et $\Delta N52$ est normale tandis que celle du mutant $\Delta N79$ est pratiquement nulle, tout comme celle du mutant ΔN . Donc, la région minimale responsable pour la perte d'expression peu être réduite aux acides aminés entre les positions 52 et 79. Curieusement, cette séquence d'acide aminé (56 à 72) est conservée dans quelques forkheads (219) et a été caractérisée comme un domaine de transactivation chez FOXJ2 (79). Cependant, la délétion de ce même domaine chez FOXJ2 n'entraîne aucune différence d'expression. Ainsi, nous étions porté à croire que cette région chez CHES1 était simplement un élément de stabilité de la protéine.

La dernière hypothèse qui, selon nous, aurait pu expliquer cette différence d'expression était la localisation cellulaire. La suppression d'un élément régulateur dans le domaine N-terminal, un signal d'export nucléaire (SEN) par exemple, aurait pour effet d'enrichir la protéine au noyau et possiblement à la chromatine. Ainsi, cette chromatine peu soluble séquestrerait les protéines empêchant leur détection. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le mutant ΔFN , qui ne peut lier la chromatine puisqu'il ne possède pas de DBD, s'exprime à des niveaux comparable à CHES1 comparativement au mutant ΔN . De plus, les niveaux d'expression des différents mutants de la portion amino-terminale sont différents lorsque les cellules sont lysées dans un tampon de lyse doux, qui ne peut solubiliser la chromatine, comparativement aux extraits Laemmli totaux qui solubilise la chromatine (figure 9 A et B). Lorsque lysée dans un tampon doux, les niveaux d'expression des différents mutant diminuent proportionnellement avec le nombre d'acides aminés

éliminés (figure 9B). En effet, les niveaux du mutant $\Delta N52$ est grandement plus faible que celle du mutant $\Delta N26$ avec le tampon doux alors que leur niveau d'expression est similaire avec le tampon laemmli. Or, ce résultat suggère plutôt qu'un élément régulateur serait présent entre les acides aminés 26 et 52. Étonnamment, l'analyse bio-informatique de la séquence de CHES1 avec un programme spécifique pour identifier des SENs potentiels riches en leucine (NetNES) (220) prédit un tel signal entre les acides aminés 35 à 50. Cependant, la présence d'un tel motif devrait être confirmée par immunofluorescence à l'aide de protéine de fusion à la GFP.

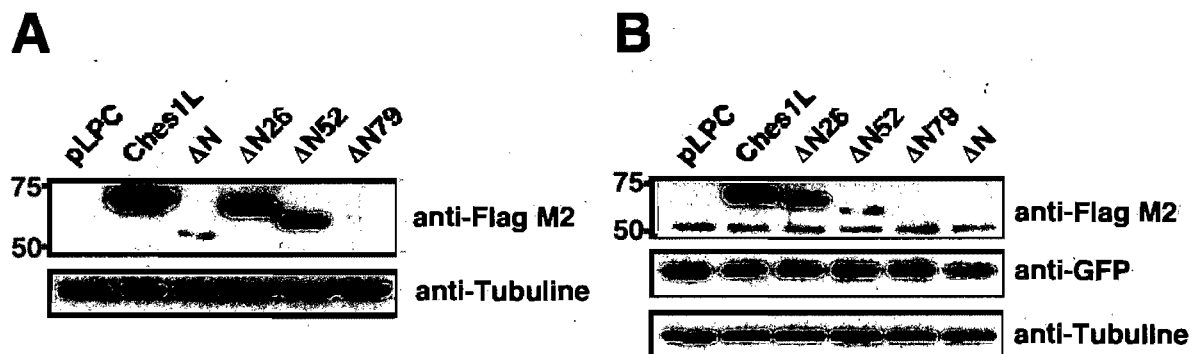


Figure 9. Le domaine amino-terminal régule la localisation cellulaire.

A) Immunobuvardage d'extraits cellulaires totaux solubilisant la chromatine (Laemmli) provenant de U2OS transfectées avec les différents mutants de délétions contenant un épitope flag (voir Annexe I). B) Immunobuvardage d'extraits cellulaires totaux ne solubilisant pas la chromatine (tampon d'IP; voir Annexe I) provenant de U2OS transfectées comme en A).

Somme toute, la raison exacte de la perte d'expression du mutant ΔN est nébuleuse et il est fort probable que plusieurs facteurs énumérés soient responsables. Ainsi, la présence d'un signal d'export nucléaire entre les acides aminés 26 à 52, une dégradation extrêmement rapide et un élément de stabilité entre les acides aminés 52 à 79 sont tous possibles.

5.2.4.2. Mécanisme d'inhibition du domaine N-terminal

Étant donné que le domaine amino-terminal est inhibiteur la question à savoir comment ce domaine peut inhiber l'action de la protéine se pose. À la lumière des observations faites à la figure 9, il est tout à fait légitime d'émettre l'hypothèse que la présence d'un signal d'export nucléaire dans ce domaine pourrait agir directement pour inhiber les fonctions de la protéine en la relocalisant au cytosol. De fait, l'inhibition par séquestration cytosolique est monnaie courante pour les protéines nucléaires, telles que les CDKs et CKIs, et pour d'autres facteurs forkhead, notamment la sous-famille FOXO (83, 84). Ensuite, une hypothèse intéressante était que le domaine N-terminal interagissait avec une autre partie de la protéine via une interaction intramoléculaire de façon à empêcher le domaine de liaison à l'ADN de s'associer à la chromatine. Cependant, aucune interaction n'a été détectée par GST pull-down.

La dernière hypothèse investiguée a été la phosphorylation. En effet, cette modification post-traductionnelle affecte la majeure partie du protéome et s'avoue un mécanisme rapide et efficace de régulation. Afin d'évaluer l'état de phosphorylation de CHES1, une approche par gel d'électrophorèse en 2 dimensions a été préconisée afin de pallier le manque d'anticorps phospho-spécifique. Comme on peut le constater à la figure 10, la migration en 2 dimensions d'extraits totaux provenant de U2OS transfectées avec CHES1 génère plusieurs points distincts suggérant ainsi que différents états de charge de la protéine sont présents. Il est possible d'affirmer que ces différents états sont causés par la phosphorylation puisque le traitement du même extrait par la phosphatase alcaline ne génère plus qu'un seul point. De plus, les différents états de charges migrent vers la borne positive ce qui confirme que les modifications observées sont belles et bien de charge négative.

Par la suite, les sites de phosphorylation ont été déterminés par spectrométrie de masse. Un premier échantillon provenant de U2OS transfectées a été analysé 48h post-

transfection. Dans cet échantillon, trois peptides phosphorylés ont été identifiés (figure 11). Fait intéressant, il s'agissait des trois mêmes fragments peptidiques, mais avec des états de phosphorylation différents. Dans ces fragments, les sérines en position 85 (S85) et 97 (S97) et la tyrosine en position 105 (Y105) étaient phosphorylées. En accord avec notre hypothèse de départ, ces résidus se situent dans le domaine N-terminal suggérant ainsi que ces phosphorylations sont inhibitrices. En effet, les deux sérines phosphorylées se retrouvent dans une séquence consensus de phosphorylation des CDKs et des MAPK (pS-P).

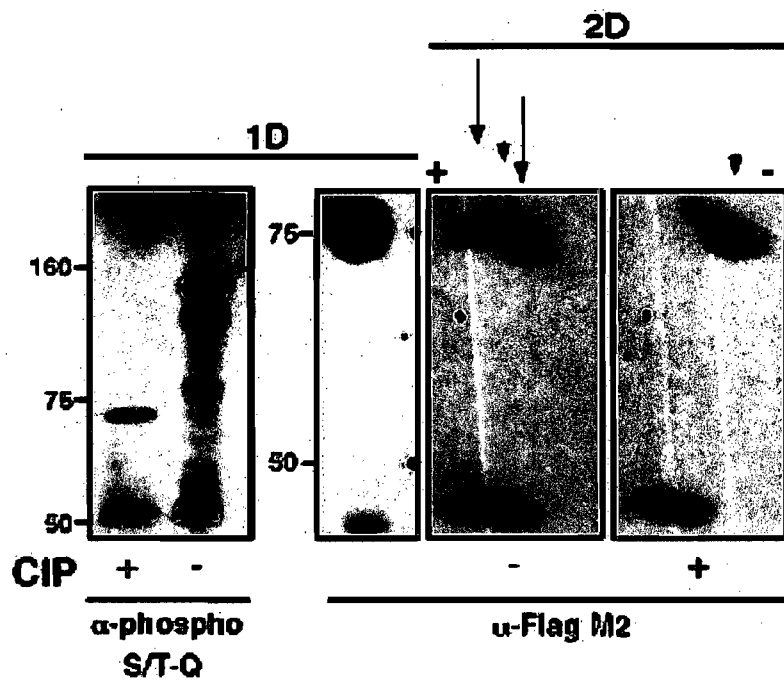


Figure 10. Ches1 est phosphorylé en plusieurs sites.

Analyse par immunobuvardage d'extraits cellulaires totaux migrés sur gels d'électrophorèse en deux dimensions. 50 µg de protéines provenant de U2OS transfectées avec Flag-CHES1L, déphosphorylées avec la CIP (Calf intestine phosphatase) ou non ont été déposées sur le gel. L'efficacité de déphosphorylation a été déterminée à l'aide d'un anticorps phospho-spécifique qui reconnaît les substrats des kinases ATM et ATR.

qui promeuvent la progression du cycle cellulaire. On s'attend donc à ce que la phosphorylation de CHES1 par n'importe quel activateur du cycle cellulaire soit inhibitrice. Fait intéressant, FOXM1 est phosphorylé par les CDKs et ERK, mais ces phosphorylations sont activatrices (3.5.2.1.2). Ainsi, les CDKs et ERK phosphorylent FOXM1 pour activer la progression en mitose d'une part et phosphorylent potentiellement CHES1 en contre partie l'empêchant ainsi d'inhiber FOXM1. Puisque ces sites phosphorylés bordent le DBD et que CHES1 semble agir via la liaison à l'ADN, il serait intéressant de voir si ces phosphorylations affectent cette liaison.

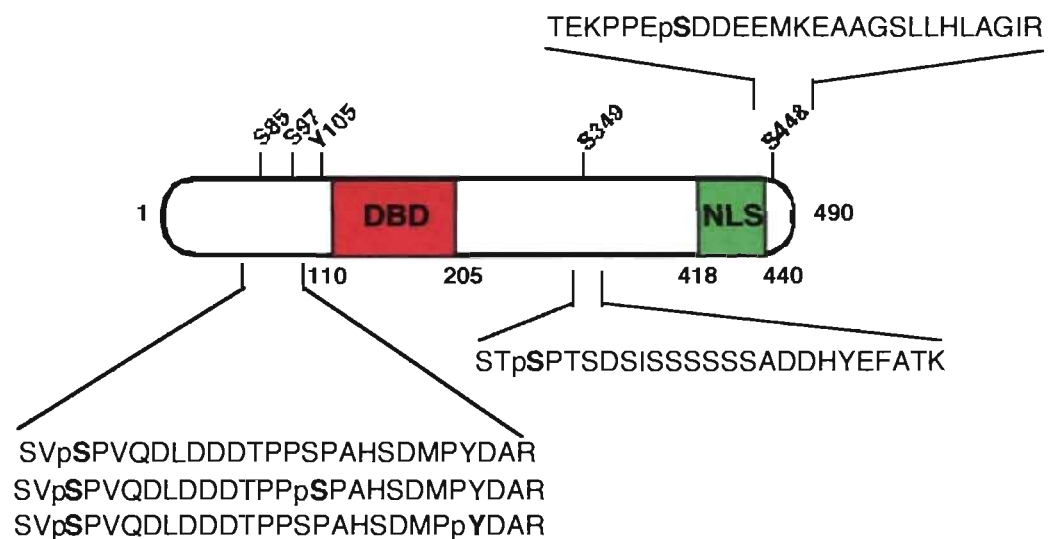


Figure 11. CHES1 est phosphorylé sur 4 sérines distinctes et une tyrosine.

Représentation schématisée des peptides phosphorylés recouverts par spectrométrie de masse (MS). La position des sites est indiquée sur le schéma et les résidus en question sont en caractère gras dans les séquences des peptides obtenus. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est en rouge alors que le signal de localisation nucléaire (NLS) est en vert.

Pour ce qui est de la tyrosine 105, elle ne se situe pas dans un site consensus connu de tyrosine kinase ce qui complique l'analyse de son rôle. Très peu de tyrosine kinases nucléaires sont connues. La mieux caractérisée de toutes est sans aucun doute la kinase

Wee1. Cependant, Wee1 est une kinase qui freine le cycle cellulaire en phosphorylant les CDKs, entre autres (221-223). Donc, on s'attendrait plutôt à ce que cette phosphorylation soit activatrice advenant que Wee1 soit la kinase qui phosphoryle ce site. Cette possibilité est plausible car rien n'empêche que les phosphorylations inhibitrices soient contre-carrées par d'autres phosphorylations activatrices d'autant plus que Wee1 agit principalement pendant la transition G₂/M.

Par la suite, nous avons voulu regarder l'état de phosphorylation de la protéine dans les fibroblastes normaux six jours après infection. Dans ce contexte, nous avons identifié trois autres peptides phosphorylés sur des sérines. Les sites les plus probables d'être phosphorylés sont les sérines 83 (S83), 349 (S349) et 448 (S448). La sérine 83 est de nouveau retrouvée ce qui indique que ce site doit être très important pour inhiber CHES1. Deux nouveaux sites ont pu être identifiés, soit S349 et S448. La sérine 349 se retrouve elle aussi dans un consensus de phosphorylation des CDKs et ERK ce qui suggère que cette phosphorylation est inhibitrice. Cependant, le mécanisme d'inhibition de cette phosphorylation est difficile à prédire puisqu'aucune fonction n'a encore été attribuée à cette région de la protéine. Finalement, La sérine 448 se retrouve dans un site consensus pour la caséine kinase 2 (CK2). La CK2 a été impliquée dans la survie cellulaire (224) ce qui suggère que cette phosphorylation serait elle aussi inhibitrice. Elle pourrait donc agir en inhibant CHES1 tout comme Akt, la kinase principale impliquée dans la survie cellulaire, inhibe les membres de la sous-famille Foxos (134). Puisque ce site de phosphorylation est à proximité du signal de localisation nucléaire carboxy-terminal, il est d'autant plus tentant de proposer que cette phosphorylation pourrait inactiver ce SLN et ainsi empêcher CHES1 de se retrouver au noyau. Somme toute, l'identification des kinases responsables de ces phosphorylations va sans aucun doute nous aider à trouver leurs fonctions et nous permettra d'en apprendre davantage sur la régulation de CHES1.

La plus lointaine association phylogénétique à CHES1 remonte à la mouche à fruit, *Drosophile melanogaster*. Cependant, l'homologue de CHES1 chez la mouche présente très

peu d'homologie de séquence avec celle de l'homme si ce n'est que d'une portion du domaine de liaison à l'ADN. De plus, la protéine chez la drosophile (NP_511071) est constituée de 1268 acides aminés comparativement à 490 chez l'humain. Puisque peu de gènes forkheads sont présents dans cet organisme, il est fort probable que CHES1 ait pris naissance d'un de ces ancêtres. Par surcroît, *C. elegans*, l'organisme le plus primitif possédant des facteurs de transcription de la famille des forkhads, ne possède pas non plus d'orthologue de CHES1. Ainsi, il semblerait que la protéine soit apparue chez les cordés durant l'évolution puisque toutes les espèces recensées possédant un orthologue de CHES1 font parties de cet embranchement. Curieusement, l'apparition de CHES1 dans l'évolution coïncide avec le besoin des organismes complexes de se protéger contre le cancer ce qui supporte son rôle dans la suppression tumorale.

L'importance de CHES1 dans la biologie est reflétée par son taux d'homologie incommensurable entre les différentes espèces (figure 12). En effet, la séquence de CHES1 de l'homme est identique à 99,8% à celle du chimpanzé tandis qu'elle l'est à 94,3% avec le rat, le mammifère présentant le moins d'identité avec la séquence de l'homme. Ce niveau d'identité diminue jusqu'à 80,6% avec la grenouille africaine, ce qui demeure tout même conservé. La forte conservation parmi les différentes espèces suggère que ces fonctions sont elles aussi conservées et que l'étude de CHES1 dans les différents organismes pourrait être directement associée au système humain. Ainsi, l'étude chez la grenouille impliquant CHES1 dans le développement de l'œil laisse croire que CHES1 aurait un rôle dans le développement chez l'humain (184). Somme toute, l'implication directe de cette grande homologie pour notre étude réside dans la conservation de chacun des sites de phosphorylation identifiés ce qui suggère qu'ils sont tous importants pour la régulation de CHES1.

Figure 12. Ches1 est une protéine extrêmement conservée parmi les espèces.

La séquence protéique de CHES1 provenant de sept espèces différentes a été alignée par la méthode ClustalW à l'aide du programme informatique MegAlign de DNA Star. Le numéro d'accèsion de chaque séquence est indiqué vis-à-vis du nom de l'espèce auquel il correspond. De haut en bas, les espèces sont l'humain, le chimpanzé, le macaque, le porc, la souris, le rat et les grenouilles africaines *tropicalis* et *laevis*. Le domaine de liaison à l'ADN est en rouge. Les signaux de localisation nucléaire sont en vert. Le signal d'export nucléaire potentiel est en jaune tandis que les régions de faible complexité sont en orange. Le site de liaison potentiel à Cdc20/Cdh1 est en bleu. Les sites de phosphorylation identifiés par MS sont identifiés par une étoile. Finalement, la région manquante dans l'isoforme court de CHES1 est dans un encadré.

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      10         20         30         40         50         60         70         80         90         100        110
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1 MG PVMPPK K K K P S G G I V S G L S Q C Y G S G F S K A L Q E D D D L D F S L P D I R L E E G A M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G E S V L R S V S P V Q D L D D D T P P S P A H S D M P Y D A Q N P K K P P S Homo sapiens NP_001078940
1 MG PVMPPK K K K P S G G I V S G L S Q C Y R G S G F S K A L Q E D D D L D F S L P D I R L E E G A M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G E S V L R S V S P V Q D L D D D T P P S P A H S D M P Y D A Q N P K K P P S Pan troglodyte XP_001140493
1 MG PVMPPK K K K P S G G I V S G L S Q C Y R G S G F S K A L Q E D D D L D F S L P D I R L E E G A M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G E S V L R S V S P V Q D L D D D T P P S P A H S D M P Y D A Q N P K K P P S Macaca mulatta XP_001087970
1 MG PVMPPK K K K P S G G I V S G L S Q C Y R G S S F S K A L Q E D D D L D F S L P D I R L E E G A M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G D S V L R S V S P V Q D L D D D T P P S P A H S D M P Y D A Q N P K K P P S Sus scrofa NP_001038001
1 MG PVMFAK K K K P S G G I V S G L S Q R Y R G S G F S K A L Q E D D D L D F P L P D I R L E E G A M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G E S V L R S V S P V Q D L D D D T P P S P A H S D M P Y D A Q N P K K P P S Mus musculus AAH99971
1 MG PVMFAK K K K P S G G I V S G L S Q R Y R G S G F S K A L Q E D D D L D F P L P D I R L E E G T M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G E S V L R S V S P V Q D L D D D T P P S P A H S D M P Y D A Q N P K K P P S Rattus norvegicus XP_234377
1 MG PIMPPK K K K P S G G I V S G S Q C Y R S S T L S N P L Q D D D L D F P P P A V K I N K E K G G M E D E E L T N L N W L H E S K N L L K S F G D T V L R S V S P V Q D I D D D T P P S P A Q S D M P Y D A Q N P K K P P S Xenopus tropicalis NP_001016300
1 MG PVMPPK K K K P S G G I V S G S Q C Y R S S T L S N P L Q D D D L D F P P P P V K I N K E K G G M E D E E L T N L N W L H E N K N L L K S F G D T V L R S V S P V Q D I D D D T P P S P A Q S D M P Y D A Q N P K K P P S Xenopus laevis CAJ38819

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      120        130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
119 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P H P H V E N T P P T C P Q A Y Q S T S G P P I W P G S T Homo sapiens NP_001078940
119 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P H P H V E N T P P T C P Q A Y Q S T S G P P I W P G S T Pan troglodyte XP_001140493
119 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P H P H V E N T P P T C P Q A Y Q S T S G P P I W P G S T Macaca mulatta XP_001087970
119 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H S H N V E N T P P A S P Q A Y Q S T S G P P I W P G S T Sus scrofa NP_001038001
119 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P P P P P T P Q A Y Q S T S G P P I W P G S T Mus musculus AAH99971
119 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P P P P P T P Q A Y Q S T S G P P I W P G S T Rattus norvegicus XP_234377
118 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P Y S H V E N T P P T S P Q A Y Q S T S V P P L W P G S T Xenopus tropicalis NP_001016300
118 F S C A L T A T E D S F T K R L P V K D I Y N W I L E H F P Y F A N A P T Q N W N S V R H L S L N K C F K K V D K E R S Q S I G G S L W C I D P E T R Q N L I Q A L K K T P Y H P Y S H V E N T P P T S P Q A Y Q S T S V P P L W P G S T Xenopus laevis CAJ38819

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      240        250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
239 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N T P P E I Q A G F P P G V I Q N G A R V L S R G L F P G V R L P I T P I G - V T A A M R N G I T S C R M R T E S E P S C G S P V V S G D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Homo sapiens NP_001078940
239 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N T P P E I Q A G F P P G V I Q N G A R V L S R G L F P G V R L P I T P I G - V T A A M R N G I T S C R M R T E S E P S C G S P V V S G D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Pan troglodyte XP_001140493
239 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N T P P E I Q A G F P P G V I Q N G A R V L S R G L F P G V R L P I T P I G - V T A A M R N G I T S C R M R T E S E P S C G S P V V S G D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Macaca mulatta XP_001087970
239 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N T P P E I Q A G F P P G V I Q N G A R V L S R G L F P G V R L P I T P I G - M T A A V R N G L T S C R M R T E S E P S C G S P V V S G D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Sus scrofa NP_001038001
231 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N T P P E I Q A G F P P G V I Q N G A R V L S R G L F P G V R L P I T P I G - M T A A I R N S I T S C R M R T E S E P S C G S P V V S G D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Mus musculus AAH99971
231 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N T P P E I Q A G F P P G V I Q N G A R V L S R G L F P G V R L P I T P I G - M T A A I R N S I T S C R M R T E S E P S C G S P V V S G D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Rattus norvegicus XP_234377
238 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N S A H E L Q A G L P P G V I Q N G A R V L N R G I F S G V R L P I N P I G A M A A S V R N G I A N C R T R M E S E P S C G S P L V S S D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Xenopus tropicalis NP_001016300
238 F T K R N G A L L Q D P D I D A A S A M M L L N S A H E L Q A G L P P G V I Q N G A R V L N R G I F S G V R L P I N P I G A M A A S V R N G I A N C R T R M E S E P S C G S P L V S S D P K E D H N Y S S A K K A N K R S S P - S D I T S S Xenopus laevis CAJ38819

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      360        370        380        390        400        410        420        430        440        450        460        470
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
358 S S S S - A D D H Y E F A T K C S Q S S S S S S S F A S S S S P S D T E E D D R K H S Q K E P K D S L G D S G Y A S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Homo sapiens NP_001078940
358 S S S S - A D D H Y E F A T K C S Q S S S S S S F A S S S S P S D T E E D D R K H S Q K E P K D S L G D S G Y A S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Pan troglodyte XP_001140493
358 S S S S - A D D H Y E F A T K C S Q S S S S S S F A S S S S P S D T E E D D R K H S Q K E P K D S L G D S G Y A S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Macaca mulatta XP_001087970
358 S S S S - A D D H Y E F A T K C G Q S S S S S S F Q S S S S H S E T E E D D R K C S P K E A K D A L G D S G Y A S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Sus scrofa NP_001038001
328 S S S S - A D D H Y E F A T K C S Q S S S S S S F Q S S S S H S E P E E D D R K P S P K E G K D A L G D S G Y A S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Mus musculus AAH99971
328 S S S S - A D D H Y E F A T K C S Q S S S S S S F Q S S S S H S E P E E D D R K P S P K E G K D A L G D S G Y A S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Rattus norvegicus XP_234377
357 S S S S - A D D H Y E F A A K V C S S S S S S D - T S F Q S S S S F S E T E E E D K K Q I K K E L K D S L V E S G Y S S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Xenopus tropicalis NP_001016300
357 S S S S - A D D H Y E F A A K V C S S S S S S D - T S F Q S S S S F S E T E E E D K K Q I K K E L K E P L V E S G Y S S Q H L K Q H L A K A R V P S D T L P L K K R R T K P P E S D D E E M K E A A G S L L H L A G T L S C A N I T N Xenopus laevis CAJ38819

```

```

-----+-----+-----+
      480        490
-----+-----+-----+
476 R T A K G Q K E Q K -- E T T K N Homo sapiens NP_001078940
476 R T A K G Q K E Q K -- E T T K N Pan troglodyte XP_001140493
478 R T A K G Q K E Q K -- E T T K N Macaca mulatta XP_001087970
471 R T A K G Q K E Q K -- E T T K N Sus scrofa NP_001038001
443 R T A K G Q K E Q K -- E T A K N Mus musculus AAH99971
443 R T A K G Q K E Q K -- E T A K N Rattus norvegicus XP_234377
470 R T A K G Q K E Q K D E T T K N Xenopus tropicalis NP_001016300
469 R T A K G Q K E Q K D E T T K N Xenopus laevis CAJ38819

```

5.3. CHES1 régule la transition G₂/M

5.3.1. Profil d'expression génétique des cellules surexprimant CHES1

L'arrêt de croissance engendré par le programme de sénescence doit nécessairement être représenté au niveau moléculaire. Alors que le profil d'expression génétique des cellules sénescents surexprimant les oncogènes est principalement caractérisé par l'augmentation de plusieurs gènes associés à l'arrêt de croissance, tel que p21, et à d'autres gènes spécifiques à la sénescence, tels que PAI-1 et ezrin, celui des cellules surexprimants CHES1 est différent. Son profil d'expression reflète plutôt son rôle de répresseur transcriptionnel puisqu'environ 80% des gènes régulés sont réprimés. Ainsi, les cellules sénescents surexprimant CHES1 ont une signature génétique bien à elles. Cette signature nous permet de confirmer le rôle soupçonné par Pati et al. dans le point de restriction de la transition G₂/M (188) puisqu'un grand nombre de gènes réprimés fonctionnent dans ces phases du cycle cellulaire.

Bien qu'on ne puisse déterminer les cibles directes de CHES1, il est possible de prédire le fonctionnement global par lequel les cellules arrêteront la division. CHES1 semble agir de façon transitoire en diminuant les niveaux de CDK1 et de la cycline B d'une part et en augmentant les niveaux de p57^{Kip2} d'une autre. La diminution de l'activité CDK-cycline combinée avec l'augmentation d'une CKI peut très bien expliquer l'arrêt de croissance précoce observé. Ainsi, CHES1 pourrait être le premier répresseur transcriptionnel identifié à faire partie du complexe inhibant la transcription de cdk1 (225) et s'ajoute à la courte liste de répresseur transcriptionnel de la transition G₂/M (226, 227). Lorsque les effets de CHES1 sont soutenus, les effets à long terme dépendront plutôt de p53 et p21 pour l'instauration du programme de sénescence (voir section 5.3.2 et figure 4D du manuscrit).

CHES1 semble aussi agir sur l'expression de gènes impliqués dans la ségrégation des chromosomes et la sortie de la mitose. En effet, PRC1, impliqué dans l'initiation de la cytokinèse (228), et survivin, qui régule la sortie de la mitose (229), sont tous deux réprimés par CHES1. De plus, CHES1 semble bloquer la progression cellulaire en empêchant l'initiation de l'anaphase et ce, en réprimant ANAPC5-7 et cdc20, tous des gènes du complexe APC/C qui régule la transition de la métaphase à l'anaphase (198). Étonnamment, nous suspectons que ce même complexe pourrait être responsable de la dégradation de CHES1 (voir section 5.1 et figure 7B).

Aussi, plusieurs gènes importants pour la stabilité génomique sont diminués : CENPF, CENPA, CENPH, H₂AX, TMPO et BBRN1. CENPA-F et H font partie d'une famille de protéines centromériques qui permettent la condensation et la ségrégation normale des chromosomes. CENPA est un variant de l'histone H3 qui s'associe spécifiquement à la chromatine centromérique et permet la genèse de cette structure spécialisée. La perte de structure causée par son inhibition entraîne une ségrégation chromosomique anormale due à l'incapacité des microtubules de s'accrocher aux kinétochores (198, 230). De plus, BBRN1 a été impliqué dans la condensation des chromosomes et sa mutation chez la levure cause un délai en G₂ avant les défauts de ségrégation des chromosomes (231). Somme toute, les défauts de ségrégation ou d'attachement des chromosomes sont habituellement détectés par le point de restriction du fuseau mitotique pour freiner la division cellulaire (232).

Cependant, CHES1 régule quelques gènes importants pour le fonctionnement du point de restriction du fuseau mitotique. BubR1, Bub1 et Mad2 sont tous réprimés ce qui va à l'encontre d'un arrêt de croissance. Malgré tout, il semble que la déficience de ce point de restriction peut contribuer au phénotype observé (voir section 5.3.2 et 5.3.3).

Le profil d'expression génétique induit par CHES1 supporte son rôle de suppresseur tumoral puisque plusieurs des gènes régulés sont impliqués dans la tumorigenèse. En effet,

la mutation de p57 peut causer le syndrome de Beckwith-Wiedeman, caractérisé par un risque accru de développer certains cancers spécifiques. Des mutations somatiques dans le gène de p57 sont aussi souvent retrouvées dans les cancers sporadiques (233). De plus, le gène de la survivin, qui fait partie de la famille des inhibiteurs de l'apoptose, a été associé à plusieurs cancers (234-236) tout comme cdk1 (203) et FOXM1 (voir section 5.3.2).

5.3.2. CHES1 antagonise FOXM1

En portant une attention particulière au profil d'expression génétique de la surexpression de CHES1, on s'aperçoit que la grande majorité des gènes de la phase G₂/M réprimés par CHES1 sont au contraire activés par FOXM1. En effet, FOXM1 est le facteur de transcription principal de l'induction des gènes requis pour la transition G₂/M tout comme E2F l'est pour la transition G₁/S (voir section 3.5.2.1.). Puisque les forkheads reconnaissent sensiblement les mêmes séquences d'ADN et que nos résultats supportent un modèle d'inhibition par compétition, nous avançons que CHES1 agit en inhibant l'expression des gènes ciblés par FOXM1. Un tel modèle d'action a d'ailleurs été décrit pour FoxG1, un autre forkhead répresseur (107). Contrairement à CHES1, FoxG1 agit plutôt comme un oncogène en inhibant l'expression de p21 par FoxO. De plus, nous avons confirmé ce modèle par essai luciférase alors que CHES1 minimisait la transactivation de FOXM1 sur un rapporteur spécifique aux forkheads. Cependant, il sera important de démontrer ce modèle sur un promoteur spécifique à FOXM1 par essai luciférase et/ou par ChIP. Aussi, nous avons démontré que l'onco-protéine E7, connue entre autres pour augmenter la transactivation de FOXM1 (164), pouvait contourner l'induction de sénescence causée par la surexpression de CHES1. Cependant, nous ne pouvons écarter la possibilité que E7 inhibe directement CHES1.

Plusieurs observations soutiennent que CHES1 antagonise FOXM1. Premièrement, les niveaux d'expression de CHES1 sont augmentés spécifiquement durant l'arrêt de croissance tandis que ceux de FOXM1 coïncident avec une prolifération active (voir section

3.5.2.1). En effet, nos résultats démontrant que CHES1 est spécifiquement augmenté durant la sénescence, qui peut être vu comme un état de différenciation terminal, sont en accord avec une diminution de FOXM1 durant la différenciation (148-150). De plus, CHES1 est exprimé davantage dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC) à long terme (LT) comparativement à celles à court terme (ST-HSC) qui ont une prolifération plus active (237). Curieusement, les LT-HSC, tout comme les fibroblastes surexprimant CHES1, expriment des niveaux supérieurs de p57 et de cycline D que les ST-HSC (237). De plus, l'expression de CHES1 corrèle inversement avec celle de FOXM1 dans les cancers. De fait, une étude a démontré que les niveaux de Ches1 diminuent durant le processus métastatique du cancer de la prostate alors que ceux de FOXM1 s'élèvent (205). De plus, il a été démontré que FOXM1 accélère le développement de cancers de la prostate (163) et CHES1 était un gène réprimé de façon dépendante des androgènes dans les LnCap, une lignée cellulaire du cancer de la prostate (238). FOXM1 contribue aussi au développement et à la croissance des cancers colorectaux (239) et il a été proposé que CHES1 était une cible potentielle d'un groupe de microARN qui sont augmentés dans ce type de cancer (207). Et finalement, FOXM1 a été identifié comme un des gènes les plus diminués durant le vieillissement (240) comparativement à nos résultats démontrant que CHES1 augmente avec l'âge chez les souris.

Notre hypothèse est aussi corroborée à partir des phénotypes observés puisque le phénotype de la surexpression de CHES1 est similaire à celui de l'inhibition de FOXM1. Comme on a pu le démontrer, la surexpression de CHES1 induit la sénescence. En retour, les souris homozygotes nulles pour Foxm1 ne sont pas viables, mais les fibroblastes embryonnaires de ces souris deviennent sénescents prématurément (157). Lorsque le gène de Foxm1 est inactivé de façon à ce que de faibles niveaux de la protéine soit exprimés (147), les souris sont viables et les cellules peuvent se diviser à quelques reprises avant d'entrer en sénescence. Pendant ces quelques divisions, plusieurs défauts de la mitose sont observables. Entre autres, les cellules présentent un arrêt prolongé en G₂ indicatif d'un défaut d'entrée en mitose attribuable à une trop faible activité cdk-cycline. La fraction de

cellules qui progressent vers la mitose présentera une ségrégation des chromosomes déficiente, des aberrations du fuseau mitotique et un point de restriction du fuseau mitotique déficient. Ces défauts résulteront en polyploïdisation et en l'amplification des centrosomes (147, 156, 157) causés par l'incapacité des cellules à compléter la cytokinèse et à l'endoréduplication (la re-réplication du matériel génétique avant d'avoir complété le cycle cellulaire) (figure 4D du manuscrit).

Bien que nous n'ayons pas démontré que les cellules surexprimant CHES1 présentent tous ces défauts, nous remarquons par simple microscopie que les cellules ont une taille anormale et accumulent un nombre impressionnant de noyaux (jusqu'à vingt par cellules). De plus, nous avons tout de même démontré que l'induction de sénescence par CHES1 était inhibée par l'onco-protéine E6 connue pour inhiber p53 et que CHES1 stabilisait p53 en diminuant son ubiquitination (figure 8). Aussi, nous avons été incapable de diminuer la formation de colonies d'une lignée cellulaire, H1299, homozygote nulle pour p53 (LD, résultat non publié). Il a été démontré que la duplication anormale des centrosomes active un point de restriction en G₁ dépendant de p53 (appelé point de restriction des centrosomes) (1) et donc que l'activation de p53 par la surexpression de CHES1 pourrait être causé par la duplication des centrosomes.

Ce phénotype est aussi observable pour les cellules déficientes pour d'autres cibles de CHES1. En effet, les fibroblastes dans lesquels Bub1 a été inactivé avec des siRNAs deviennent sénescents prématurément et ce, de façon dépendante de p53 (241). De plus, l'inhibition de plusieurs cibles de FOXM1 tels que survivin, Plk1, Aurora kinase A, CENPA et CENPF mène à l'accumulation d'aberrations chromosomiques et à l'instabilité génomique (147, 242). Bien que toutes ces cibles n'aient pas été identifiées dans l'arrays, des résultats préliminaires indiquent que les niveaux de Plk1 sont diminués par la surexpression de CHES1.

5.3.3. CHES1 et le vieillissement

Il a été suggéré que le vieillissement est le prix à payer de la suppression tumorale. Le lien moléculaire entre la sénescence et le vieillissement provient d'une étude qui démontre que les niveaux d'expression de p16^{INK4a}, un régulateur de sénescence bien établi, augmentent dramatiquement dans les tissus âgés (243). Ainsi, nos résultats démontrant que CHES1 peut, tout comme p16^{INK4a}, induire la sénescence et que ses niveaux d'expression sont en hausses dans le foie des vieux rats soutiennent que CHES1 peut protéger l'organisme contre le cancer, mais qu'il contribue aussi au vieillissement, supportant ainsi la notion de pléiotropie antagoniste (voir section 2.1).

Il a récemment été proposé que le vieillissement pourrait être causé, en partie, par l'augmentation d'erreurs durant la mitose (240). En effet, les auteurs ont démontré que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la transition G₂/M était réduite chez les personnes âgées comparativement aux personnes de jeune et moyen âge. Curieusement, FOXM1 était le gène le plus réprimé durant le vieillissement et plusieurs de ses cibles transcriptionnelles l'étaient aussi (240). L'analyse approfondie des gènes réprimés durant le vieillissement nous a permis de constater que CHES1 réprime l'expression de plusieurs gènes identifiés dans cette étude : FOXM1, cycline A, cycline B, Cdc20, CENPF, CENPA, H₂AX, RanBP1, HMG-2, MCL1, KIF2C. De plus, les cellules provenant d'individus d'âge avancé sont caractérisées par une incidence accrue de polyploïdie (240). Ainsi, nous proposons que CHES1, par sa capacité de réprimer FOXM1 et ses gènes cibles, contribue au dysfonctionnement de l'appareillage mitotique observé durant le vieillissement. Cette hypothèse est soutenue par une autre étude démontrant que les souris génétiquement modifiées pour exprimer de très faible niveau de BubR1, un autre gène réprimé par CHES1, présentent un phénotype de vieillissement accéléré (244).

L'identification de CHES1 en tant que gène pro-vieillescence ajoute un autre membre des forkheads dans la biologie du vieillissement. En effet, les FoxOs et, plus

récemment, les FoxA ont été associés à ce processus (82, 245, 246). Cependant, ces deux sous-familles agissent plutôt pour retarder le vieillissement en agissant sur le métabolisme. L'impact de cette découverte est immense puisqu'elle nous a permis d'identifier un gène qui pourrait être impliqué dans la pathogenèse de certaines maladies du vieillissement et ouvre une toute nouvelle porte au traitement de ces maladies. Notons, entre autres, que les niveaux d'expression de CHES1 sont augmentés chez les patients souffrant d'arthrite depuis au moins 10 ans comparativement à ceux qui l'ont depuis moins de deux ans. De plus, puisque FOXM1 est requis pour maintenir la masse des cellules bêta du pancréas après la naissance (247) et qu'un locus comprenant le gène de CHES1 a été identifié dans la susceptibilité au diabète, il serait possible que CHES1 soit en cause lors de l'apparition tardive du diabète (186).

CHES1 pourrait aussi être impliqué dans l'Alzheimer puisque les niveaux d'expression de la préséniline (PSEN1) sont diminués par la surexpression de CHES1. La préséniline fait partie d'un complexe enzymatique, la sécrétase- γ , qui régule le clivage de la protéine précurseur de la β -amyloïde (APP). L'Alzheimer est causé principalement par une accumulation de fibres de β -amyloïde insoluble, lesquelles sont produites par le clivage inadéquat de l'APP (248). Ainsi, en régulant les niveaux d'expression de la préséniline, CHES1 pourrait contribuer au déséquilibre de la production des peptides de la β -amyloïde et ainsi promouvoir l'apparition de la maladie. Sachant que la déacétylase SIRT1, bien connue pour ses fonctions anti-vieillessement (249), cible principalement les forkheads et qu'elle a tout récemment été impliquée dans la protection des neurones contre l'Alzheimer (250), il serait intéressant de voir si ses effets sont causés par l'inhibition de CHES1.

5.4. Directions futures

Nos études nous ont permis de caractériser davantage ce facteur de transcription, mais ont, du même coup, apportées une multitude de questions auxquelles nous devons

répondre. À court terme, la validation de notre modèle d'action par compétition est primordiale. L'identification des cibles directes de CHES1, par ChIP, est la première étape de ce processus. Plusieurs expériences seront aussi entreprises afin de solidifier notre hypothèse que CHES1 antagonise FOXM1. Entre autres, nous testerons la capacité de FOXM1 de contourner ou d'empêcher l'induction de sénescence par CHES1 dans le modèle de fibroblastes en culture. Nous pourrions aussi tester la capacité de CHES1 à réprimer l'expression du récepteur de l'œstrogène (ER α), celui-ci étant régulé par FOXM1 dans les lignées cellulaires de cancer du sein (251). De plus, puisque FOXM1 est associé à plusieurs cancers, nous testerons la capacité de CHES1 à réduire l'incidence de cancers dans ces systèmes *in vivo* (155, 162, 163, 239).

À plus long terme, l'étude de CHES1 au niveau endogène sera aussi très importante. Nous devons déterminer la régulation de CHES1 en fonction du cycle cellulaire. Nous devons déterminer ses niveaux d'expression, d'une part et sa régulation post-traductionnelle de l'autre dans les différentes phases du cycle cellulaire. Tel qu'indiqué précédemment, l'identification des kinases régulant l'activité de CHES1, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, sera très importante et pourra être testée par essai kinase *in vitro*. Enfin, l'étude de cellules dépourvues du produit du gène de CHES1 grâce à l'utilisation de shRNA, nous permettra de tester l'importance de ce gène dans le phénomène de sénescence et du contrôle de la transition G₂/M. La génération de souris génétiquement modifiées sera d'autant plus intéressante puisqu'elle permettra de tester toutes nos hypothèses au niveau de l'organisme. Alors que les souris homozygotes nulles pour CHES1 devraient présenter une incidence accrue de cancers, les souris transgéniques surexprimant CHES1 devraient présenter les caractéristiques du vieillissement accéléré.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En somme, nos études ont permis d'identifier un nouveau régulateur du point de restriction G₂/M chez les cellules humaines possédant les propriétés d'un suppresseur tumoral. Tout comme Rb inhibe les facteurs de transcription de la famille E2F pour bloquer la progression des cellules en phase G₁, CHES1 semble agir en inhibant le facteur de transcription FOXM1 pour arrêter les cellules en phases G₂. Dans un contexte cellulaire normal, les niveaux de CHES1 s'assureraient que les cellules soient aptes à progresser vers la mitose et agiraient ainsi pour conserver l'intégrité du génome. Lorsque ces cellules présenteraient des défauts persistants, l'action soutenue de CHES1 entraînerait l'induction du programme de sénescence pour empêcher l'accumulation de défauts génétiques indésirables. De plus, au cours de la vie, les niveaux d'expression grandissant de CHES1 perturberaient l'intégrité du mécanisme de transition G₂/M observé lors du vieillissement et contribueraient au développement de certaines maladies. Ainsi, l'étude approfondie de cette molécule ouvrira la voie à de nouvelles avenues pour le traitement de certains cancers et possiblement de certaines maladies associées au vieillissement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mikule K, Delaval B, Kaldis P, Jurczyk A, Hergert P, Doxsey S. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat Cell Biol* 2007;9(2):160-70.
2. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 2002;36:617-56.
3. Smith AP, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ. DNA-damage-independent checkpoints: yeast and higher eukaryotes. *Cell Cycle* 2002;1(1):16-33.
4. Bunnell BA, Heath LS, Adams DE, Lahti JM, Kidd VJ. Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(19):7467-71.
5. Meyerson M, Enders GH, Wu CL, *et al.* A family of human cdc2-related protein kinases. *Embo J* 1992;11(8):2909-17.
6. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;60(14):3689-95.
7. Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92(14):6289-93.
8. Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Current opinion in genetics & development* 2003;13(1):77-83.
9. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2002;2(2):103-12.
10. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85(1):27-37.
11. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432(7015):307-15.
12. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432(7015):316-23.
13. Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science (New York, NY)* 2003;299(5611):1355-9.
14. Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature* 2000;408(6809):233-8.
15. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Experimental gerontology* 2003;38(1-2):5-11.
16. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-36.
17. Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92(20):9363-7.
18. Narita M, Nunez S, Heard E, *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003;113(6):703-16.
19. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426(6963):194-8.

20. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 2007;21(1):43-8.
21. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88(5):593-602.
22. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998;12(19):2997-3007.
23. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006;444(7119):638-42.
24. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006;444(7119):633-7.
25. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12(19):3008-19.
26. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005;436(7051):660-5.
27. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005;436(7051):725-30.
28. Collado M, Gil J, Efeyan A, *et al.* Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005;436(7051):642.
29. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436(7051):720-4.
30. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279(5349):349-52.
31. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, *et al.* Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2006;8(10):1053-63.
32. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 2004;5(1):1-10.
33. Lee AC, Fenster BE, Ito H, *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999;274(12):7936-40.
34. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(6):705-9.
35. Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001;268(10):2784-91.
36. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000;14(16):2015-27.

37. Mallette FA, Goumard S, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Ferbeyre G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 2004;23(1):91-9.
38. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 2003;22(16):4212-22.
39. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997;277(5327):831-4.
40. Benanti JA, Galloway DA. Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol Cell Biol* 2004;24(7):2842-52.
41. Itahana K, Zou Y, Itahana Y, *et al.* Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003;23(1):389-401.
42. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(24):13742-7.
43. Brookes S, Rowe J, Ruas M, *et al.* INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Embo J* 2002;21(12):2936-45.
44. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005;120(4):513-22.
45. Paradis V, Youssef N, Dargere D, *et al.* Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 2001;32(3):327-32.
46. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006;311(5765):1257.
47. Mishima K, Handa JT, Aotaki-Keen A, Luty GA, Morse LS, Hjelmeland LM. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(7):1590-3.
48. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 3):485-96.
49. Patil CK, Mian IS, Campisi J. The thorny path linking cellular senescence to organismal aging. *Mechanisms of ageing and development* 2005;126(10):1040-5.
50. Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989;57(4):645-58.
51. Weigel D, Jackle H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* 1990;63(3):455-6.
52. Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE, Jr. Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes Dev* 1991;5(3):416-27.
53. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet* 2003;19(6):339-44.

54. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000;14(2):142-6.
55. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human FOXN6, mouse Foxn6, and rat Foxn6 genes in silico. *Int J Oncol* 2004;25(1):219-23.
56. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human FOXN5 and rat Foxn5 genes in silico. *Int J Oncol* 2004;24(5):1339-44.
57. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human FOXK1 gene in silico. *Int J Mol Med* 2004;14(1):127-32.
58. Kaufmann E, Knochel W. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 1996;57(1):3-20.
59. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 1993;364(6436):412-20.
60. Gajiwala KS, Chen H, Cornille F, *et al.* Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* 2000;403(6772):916-21.
61. Liu PP, Chen YC, Li C, *et al.* Solution structure of the DNA-binding domain of interleukin enhancer binding factor 1 (FOXK1a). *Proteins* 2002;49(4):543-53.
62. Stroud JC, Wu Y, Bates DL, *et al.* Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure* 2006;14(1):159-66.
63. van Dongen MJ, Cederberg A, Carlsson P, Enerback S, Wikstrom M. Solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the adipocyte-transcription factor FREAC-11. *J Mol Biol* 2000;296(2):351-9.
64. Weigelt J, Climent I, Dahlman-Wright K, Wikstrom M. Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry* 2001;40(20):5861-9.
65. Wijchers PJ, Burbach JP, Smidt MP. In control of biology: of mice, men and Foxes. *Biochem J* 2006;397(2):233-46.
66. Marsden I, Jin C, Liao X. Structural changes in the region directly adjacent to the DNA-binding helix highlight a possible mechanism to explain the observed changes in the sequence-specific binding of winged helix proteins. *J Mol Biol* 1998;278(2):293-9.
67. Overdier DG, Porcella A, Costa RH. The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol Cell Biol* 1994;14(4):2755-66.
68. Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P. Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *Embo J* 1994;13(20):5002-12.
69. Cirillo LA, Zaret KS. Specific interactions of the wing domains of FOXA1 transcription factor with DNA. *J Mol Biol* 2007;366(3):720-4.
70. Jin C, Marsden I, Chen X, Liao X. Dynamic DNA contacts observed in the NMR structure of winged helix protein-DNA complex. *J Mol Biol* 1999;289(4):683-90.
71. Li S, Weidenfeld J, Morrissey EE. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol* 2004;24(2):809-22.

72. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(4):183-9.
73. Ernstsson S, Betz R, Lagercrantz S, *et al.* Cloning and characterization of freac-9 (FKHL17), a novel kidney-expressed human forkhead gene that maps to chromosome 1p32-p34. *Genomics* 1997;46(1):78-85.
74. Shu W, Yang H, Zhang L, Lu MM, Morrisey EE. Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *J Biol Chem* 2001;276(29):27488-97.
75. Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 2004;380(Pt 2):297-309.
76. Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol* 2001;21(10):3534-46.
77. Hellqvist M, Mahlapuu M, Blixt A, Enerback S, Carlsson P. The human forkhead protein FREAC-2 contains two functionally redundant activation domains and interacts with TBP and TFIIB. *J Biol Chem* 1998;273(36):23335-43.
78. Qian X, Costa RH. Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* 1995;23(7):1184-91.
79. Gomez-Ferreria MA, Rey-Campos J. Functional domains of FOXJ2. *J Mol Biol* 2003;329(4):631-44.
80. Berry FB, Saleem RA, Walter MA. FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain. *J Biol Chem* 2002;277(12):10292-7.
81. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, *et al.* The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997;389(6654):994-9.
82. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997;278(5341):1319-22.
83. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96(6):857-68.
84. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 2001;21(3):952-65.
85. Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(13):7421-6.
86. Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and

- nuclear/cytosolic localization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100(20):11624-9.
87. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. FEBS Lett 1996;399(3):333-8.
 88. Rena G, Woods YL, Prescott AR, *et al.* Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. Embo J 2002;21(9):2263-71.
 89. Woods YL, Rena G, Morrice N, *et al.* The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. Biochem J 2001;355(Pt 3):597-607.
 90. Ma RY, Tong TH, Cheung AM, Tsang AC, Leung WY, Yao KM. Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. J Cell Sci 2005;118(Pt 4):795-806.
 91. Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM, Xiang M. Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. Neuron 2004;43(6):795-807.
 92. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, *et al.* Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. Cell 2004;116(4):551-63.
 93. Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, Fukamizu A. Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. Int J Mol Med 2003;12(4):503-8.
 94. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102(32):11278-83.
 95. Aoki M, Jiang H, Vogt PK. Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004;101(37):13613-7.
 96. Plas DR, Thompson CB. Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. J Biol Chem 2003;278(14):12361-6.
 97. Huang H, Regan KM, Wang F, *et al.* Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102(5):1649-54.
 98. Hu MC, Lee DF, Xia W, *et al.* IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. Cell 2004;117(2):225-37.
 99. van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, *et al.* FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. Nat Cell Biol 2006;8(10):1064-73.
 100. Hofmann K, Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. Trends Biochem Sci 1995;20(9):347-9.
 101. Hammet A, Pike BL, McNees CJ, Conlan LA, Tennis N, Heierhorst J. FHA domains as phospho-threonine binding modules in cell signaling. IUBMB Life 2003;55(1):23-7.
 102. Durocher D, Jackson SP. The FHA domain. FEBS Lett 2002;513(1):58-66.

103. Futcher B. Microarrays and cell cycle transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(6):710-5.
104. Wittenberg C, Reed SI. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 2005;24(17):2746-55.
105. Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 1997;389(6646):85-9.
106. Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 1996;383(6602):691-6.
107. Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 2004;117(2):211-23.
108. Li P, Lee H, Guo S, Unterman TG, Jenster G, Bai W. AKT-independent protection of prostate cancer cells from apoptosis mediated through complex formation between the androgen receptor and FKHR. *Mol Cell Biol* 2003;23(1):104-18.
109. Zhao HH, Herrera RE, Coronado-Heinsohn E, *et al.* Forkhead homologue in rhabdomyosarcoma functions as a bifunctional nuclear receptor-interacting protein with both coactivator and corepressor functions. *J Biol Chem* 2001;276(30):27907-12.
110. Savkur RS, Burris TP. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 2004;63(3):207-12.
111. Major ML, Lepe R, Costa RH. Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators. *Mol Cell Biol* 2004;24(7):2649-61.
112. Berry FB, Lines MA, Oas JM, *et al.* Functional interactions between FOXC1 and PITX2 underlie the sensitivity to FOXC1 gene dose in Axenfeld-Rieger syndrome and anterior segment dysgenesis. *Hum Mol Genet* 2006;15(6):905-19.
113. Guo Y, Costa R, Ramsey H, *et al.* The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(6):3663-7.
114. Foucher I, Montesinos ML, Volovitch M, Prochiantz A, Trembleau A. Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for direct interaction of homeoproteins and Fox transcription factors. *Development* 2003;130(9):1867-76.
115. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* 2000;20(20):7583-90.
116. van der Heide LP, Smidt MP. Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem Sci* 2005;30(2):81-6.
117. Shim EY, Woodcock C, Zaret KS. Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev* 1998;12(1):5-10.

118. Yang Q, Kong Y, Rothermel B, Garry DJ, Bassel-Duby R, Williams RS. The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF-beta) forms a co-repressor complex with mammalian sin3B. *Biochem J* 2000;345 Pt 2:335-43.
119. Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(5):L823-38.
120. Lantz KA, Kaestner KH. Winged-helix transcription factors and pancreatic development. *Clin Sci (Lond)* 2005;108(3):195-204.
121. Baxter RM, Brissette JL. Role of the nude gene in epithelial terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 2002;118(2):303-9.
122. Cheung M, Chaboissier MC, Mynett A, Hirst E, Schedl A, Briscoe J. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell* 2005;8(2):179-92.
123. Friedman JR, Kaestner KH. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(19-20):2317-28.
124. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 2001;106(5):563-73.
125. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004;117(4):421-6.
126. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):305-10.
127. Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated T(reg) cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol* 2007;8(4):333-4.
128. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8(5):457-62.
129. Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4(11):889-99.
130. Jonsson H, Peng SL. Forkhead transcription factors in immunology. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(4):397-409.
131. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993;366(6454):461-4.
132. Johnson TE. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 1990;249(4971):908-12.
133. Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 1998;12(16):2488-98.
134. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005;24(50):7410-25.
135. Kops GJ, Medema RH, Glassford J, *et al.* Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* 2002;22(7):2025-36.

136. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002;419(6904):316-21.
137. Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 2002;295(5564):2450-2.
138. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, *et al.* FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* 2002;156(3):531-42.
139. Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* 2003;162(4):613-22.
140. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer cell* 2002;2(1):81-91.
141. Giannakou ME, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* 2004;14(8):408-12.
142. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, *et al.* Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell* 1998;9(12):3273-97.
143. Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet* 1999;22(3):281-5.
144. Koch C, Moll T, Neuberg M, Ahorn H, Nasmyth K. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* 1993;261(5128):1551-7.
145. Kumar R, Reynolds DM, Shevchenko A, Shevchenko A, Goldstone SD, Dalton S. Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr Biol* 2000;10(15):896-906.
146. Koranda M, Schleiffer A, Endler L, Ammerer G. Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* 2000;406(6791):94-8.
147. Laoukili J, Kooistra MR, Bras A, *et al.* FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat Cell Biol* 2005;7(2):126-36.
148. Korver W, Roose J, Wilson A, Clevers H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in actively dividing lymphocytes. *Immunobiology* 1997;198(1-3):157-61.
149. Korver W, Roose J, Clevers H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res* 1997;25(9):1715-9.
150. Ye H, Kelly TF, Samadani U, *et al.* Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol* 1997;17(3):1626-41.
151. Ye H, Holterman AX, Yoo KW, Franks RR, Costa RH. Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase. *Mol Cell Biol* 1999;19(12):8570-80.
152. Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse

- liver regeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99(26):16881-6.
153. Westendorf JM, Rao PN, Gerace L. Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994;91(2):714-8.
154. Luscher-Firzlaff JM, Lilischkis R, Luscher B. Regulation of the transcription factor FOXM1c by Cyclin E/CDK2. FEBS Lett 2006;580(7):1716-22.
155. Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, *et al.* Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. Genes Dev 2004;18(7):830-50.
156. Wonsey DR, Follettie MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. Cancer Res 2005;65(12):5181-9.
157. Wang IC, Chen YJ, Hughes D, *et al.* Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. Mol Cell Biol 2005;25(24):10875-94.
158. Kim IM, Ramakrishna S, Gusarova GA, Yoder HM, Costa RH, Kalinichenko VV. The forkhead box m1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature. J Biol Chem 2005;280(23):22278-86.
159. Krupczak-Hollis K, Wang X, Kalinichenko VV, *et al.* The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. Dev Biol 2004;276(1):74-88.
160. Liu ST, Hittle JC, Jablonski SA, Campbell MS, Yoda K, Yen TJ. Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis. Nat Cell Biol 2003;5(4):341-5.
161. Johnson VL, Scott MI, Holt SV, Hussein D, Taylor SS. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. J Cell Sci 2004;117(Pt 8):1577-89.
162. Kim IM, Ackerson T, Ramakrishna S, *et al.* The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. Cancer Res 2006;66(4):2153-61.
163. Kalin TV, Wang IC, Ackerson TJ, *et al.* Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. Cancer Res 2006;66(3):1712-20.
164. Luscher-Firzlaff JM, Westendorf JM, Zwicker J, *et al.* Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. Oncogene 1999;18(41):5620-30.
165. Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, Kawamata N, Miller CW, Koeffler HP. p27/Kip1 mutation found in breast cancer. Cancer Res 1996;56(10):2400-4.
166. Rodriguez S, Khabir A, Keryer C, *et al.* Conventional and array-based comparative genomic hybridization analysis of nasopharyngeal carcinomas from the Mediterranean area. Cancer Genet Cytogenet 2005;157(2):140-7.

167. Singh B, Gogineni SK, Sacks PG, *et al.* Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res* 2001;61(11):4506-13.
168. Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia* 2004;6(6):744-50.
169. Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000;404(6779):782-7.
170. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, *et al.* Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 2002;22(22):7842-52.
171. Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero MR, Carrera AC. Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 2004;24(5):2181-9.
172. Alvarez B, Martinez AC, Burgering BM, Carrera AC. Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* 2001;413(6857):744-7.
173. Tran H, Brunet A, Grenier JM, *et al.* DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002;296(5567):530-4.
174. Williamson EA, Wolf I, O'Kelly J, Bose S, Tanosaki S, Koeffler HP. BRCA1 and FOXA1 proteins coregulate the expression of the cell cycle-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 2006;25(9):1391-9.
175. Hawke TJ, Jiang N, Garry DJ. Absence of p21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice. *J Biol Chem* 2003;278(6):4015-20.
176. Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004;25(5):1495-500.
177. Li C, Lusk AJ, Sparkes R, Tran SM, Gaynor R. Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein HTLF. *Genomics* 1992;13(3):658-64.
178. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 1994;372(6501):103-7.
179. Mecklenburg L, Paus R, Halata Z, Bechtold LS, Fleckman P, Sundberg JP. FOXN1 is critical for onycholemmal terminal differentiation in nude (Foxn1) mice. *J Invest Dermatol* 2004;123(6):1001-11.
180. Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* 2003;4(11):1128-35.

181. Schuff M, Rossner A, Donow C, Knochel W. Temporal and spatial expression patterns of FoxN genes in *Xenopus laevis* embryos. *Int J Dev Biol* 2006;50(4):429-34.
182. Danilova N, Visel A, Willett CE, Steiner LA. Expression of the winged helix/forkhead gene, *foxn4*, during zebrafish development. *Brain Res Dev Brain Res* 2004;153(1):115-9.
183. Gouge A, Holt J, Hardy AP, Sowden JC, Smith HK. Foxn4--a new member of the forkhead gene family is expressed in the retina. *Mech Dev* 2001;107(1-2):203-6.
184. Schuff M, Rossner A, Wacker SA, Donow C, Gessert S, Knochel W. FoxN3 is required for craniofacial and eye development of *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 2007;236(1):226-39.
185. Ejima Y, Yang L. Determination of the genotype of a panel of human tumor cell lines for the human homologues of yeast cell cycle checkpoint control genes: identification of cell lines carrying homoallelic missense base substitutions. *Somat Cell Mol Genet* 1999;25(1):41-8.
186. Field LL, Tobias R, Thomson G, Plon S. Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a locus (IDDM11) on human chromosome 14q24.3-q31. *Genomics* 1996;33(1):1-8.
187. Sato S, Hasebe H, Sato S, *et al.* High-resolution physical mapping and construction of a porcine contig spanning the intramuscular fat content QTL. *Anim Genet* 2006;37(2):113-20.
188. Pati D, Keller C, Groudine M, Plon SE. Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA. *Mol Cell Biol* 1997;17(6):3037-46.
189. Scott KL, Plon SE. Loss of Sin3/Rpd3 histone deacetylase restores the DNA damage response in checkpoint-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2003;23(13):4522-31.
190. Busygina V, Kottemann MC, Scott KL, Plon SE, Bale AE. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Interacts with Forkhead Transcription Factor CHES1 in DNA Damage Response. *Cancer Res* 2006;66(17):8397-403.
191. Scott KL, Plon SE. CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor. *Gene* 2005;359:119-26.
192. Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Hayward SD. A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol* 2000;74(4):1939-47.
193. Kim H, Lee JE, Cho EJ, Liu JO, Youn HD. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res* 2003;63(19):6135-9.
194. Gobl AE, Berg M, Lopez-Egido JR, Oberg K, Skogseid B, Westin G. Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1999;1447(1):51-6.
195. Whitney EM, Ghaleb AM, Chen X, Yang VW. Transcriptional profiling of the cell cycle checkpoint gene *kruppel-like factor 4* reveals a global inhibitory function in macromolecular biosynthesis. *Gene Expr* 2006;13(2):85-96.

196. Moiseeva O, Mallette FA, Mukhopadhyay UK, Moores A, Ferbeyre G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Molecular biology of the cell* 2006;17(4):1583-92.
197. Puntervoll P, Linding R, Gemund C, *et al.* ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3625-30.
198. Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(9):644-56.
199. Bjorkqvist AM, Wolf M, Nordling S, *et al.* Deletions at 14q in malignant mesothelioma detected by microsatellite marker analysis. *Br J Cancer* 1999;81(7):1111-5.
200. De Rienzo A, Jhanwar SC, Testa JR. Loss of heterozygosity analysis of 13q and 14q in human malignant mesothelioma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28(3):337-41.
201. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(4):173-8.
202. O'Driscoll L, McMorrow J, Doolan P, *et al.* Investigation of the molecular profile of basal cell carcinoma using whole genome microarrays. *Mol Cancer* 2006;5:74.
203. Chang JT, Wang HM, Chang KW, *et al.* Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and underexpression of CHES1. *Int J Cancer* 2005;114(6):942-9.
204. Lu C, Bonome T, Li Y, *et al.* Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007;67(4):1757-68.
205. Chandran UR, Ma C, Dhir R, *et al.* Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cancer* 2007;7:64.
206. El-Rifai W, Frierson HF, Jr., Harper JC, Powell SM, Knuutila S. Expression profiling of gastric adenocarcinoma using cDNA array. *Int J Cancer* 2001;92(6):832-8.
207. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, *et al.* Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006;5:29.
208. Brownlee NA, Perkins LA, Stewart W, *et al.* Recurring translocation (10;17) and deletion (14q) in clear cell sarcoma of the kidney. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(3):446-51.
209. Struckmann K, Schraml P, Simon R, *et al.* Impaired expression of the cell cycle regulator BTG2 is common in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64(5):1632-8.
210. Alimov A, Sundelin B, Wang N, Larsson C, Bergerheim U. Loss of 14q31-q32.2 in renal cell carcinoma is associated with high malignancy grade and poor survival. *Int J Oncol* 2004;25(1):179-85.
211. Greenwald RJ, Tumang JR, Sinha A, *et al.* E mu-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia. *Blood* 2004;103(4):1475-84.

212. Choi SL, Choi YS, Kim YK, *et al.* Proteomic analysis and the antimetastatic effect of N-(4-methyl)phenyl-O-(4-methoxy) phenyl-thionocarbamate-induced apoptosis in human melanoma SK-MEL-28 cells. *Arch Pharm Res* 2006;29(3):224-34.
213. Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* 2000;7(8):639-43.
214. Sudol M, Sliwa K, Russo T. Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett* 2001;490(3):190-5.
215. Kawasaki A, Matsumura I, Kataoka Y, Takigawa E, Nakajima K, Kanakura Y. Opposing effects of PML and PML/RAR alpha on STAT3 activity. *Blood* 2003;101(9):3668-73.
216. Pohl BS, Knochel W. Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 2001;103(1-2):93-106.
217. Cokol M, Nair R, Rost B. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* 2000;1(5):411-5.
218. Zhu J, Gianni M, Kopf E, *et al.* Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(26):14807-12.
219. Perez-Sanchez C, Gomez-Ferreria MA, de La Fuente CA, *et al.* FHX, a novel fork head factor with a dual DNA binding specificity. *J Biol Chem* 2000;275(17):12909-16.
220. la Cour T, Kierner L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 2004;17(6):527-36.
221. Parker LL, Atherton-Fessler S, Piwnica-Worms H. p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(7):2917-21.
222. Parker LL, Piwnica-Worms H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 1992;257(5078):1955-7.
223. Piwnica-Worms H, Atherton-Fessler S, Lee MS, Ogg S, Swenson KI, Parker LL. p107wee1 is a serine/threonine and tyrosine kinase that promotes the tyrosine phosphorylation of the cyclin/p34cdc2 complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1991;56:567-76.
224. Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* 2002;12(5):226-30.
225. Dahler AL, Jones SJ, Dicker AJ, Saunders NA. Keratinocyte growth arrest is associated with activation of a transcriptional repressor element in the human cdk1 promoter. *J Cell Physiol* 1998;177(3):474-82.
226. Testoni B, Mantovani R. Mechanisms of transcriptional repression of cell-cycle G2/M promoters by p63. *Nucleic Acids Res* 2006;34(3):928-38.
227. Imbriano C, Gurtner A, Cocchiarella F, *et al.* Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol* 2005;25(9):3737-51.

228. Jiang W, Jimenez G, Wells NJ, *et al.* PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell* 1998;2(6):877-85.
229. Kallio MJ, Nieminen M, Eriksson JE. Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *Faseb J* 2001;15(14):2721-3.
230. Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, *et al.* Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(3):1148-53.
231. Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, *et al.* CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* 2003;5(6):853-64.
232. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(5):379-93.
233. Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, *et al.* Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 1997;387(6629):151-8.
234. Caldas H, Holloway MP, Hall BM, Qualman SJ, Altura RA. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *J Med Genet* 2006;43(2):119-28.
235. Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(2):635-40.
236. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;114(8):1117-27.
237. Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* 2005;1(3):e28.
238. Ma AH, Xia L, Desai SJ, *et al.* Male Germ Cell-Associated Kinase, a Male-Specific Kinase Regulated by Androgen, Is a Coactivator of Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 2006;66(17):8439-47.
239. Yoshida Y, Wang IC, Yoder HM, Davidson NO, Costa RH. The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007;132(4):1420-31.
240. Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 2000;287(5462):2486-92.
241. Gjoerup OV, Wu J, Chandler-Militello D, *et al.* Surveillance mechanism linking Bub1 loss to the p53 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(20):8334-9.
242. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2007;17(1):60-5.
243. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004;114(9):1299-307.

244. Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, *et al.* BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* 2004;36(7):744-9.
245. Panowski SH, Wolff S, Aguilaniu H, Durieux J, Dillin A. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* 2007;447(7144):550-5.
246. Bishop NA, Guarente L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 2007;447(7144):545-9.
247. Zhang H, Ackermann AM, Gusarova GA, *et al.* The FoxM1 transcription factor is required to maintain pancreatic beta-cell mass. *Mol Endocrinol* 2006;20(8):1853-66.
248. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(2):101-12.
249. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature reviews* 2005;6(4):298-305.
250. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, *et al.* SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Embo J* 2007;26(13):3169-79.
251. Madureira PA, Varshochi R, Constantinidou D, *et al.* The Forkhead box M1 protein regulates the transcription of the estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281(35):25167-76.
252. Larcher JC, Boucher D, Ginzburg I, Gros F, Denoulet P. Heterogeneity of Tau proteins during mouse brain development and differentiation of cultured neurons. *Dev Biol* 1992;154(1):195-204.

ANNEXES

ANNEXE I : Matériel et méthodes des figures présentés dans la discussion

ADNc et constructions

Les mutants de délétions du domaine N-terminal ont tous été générés par PCR en utilisant la construction de pLPC-Flag CHES1L comme étalon. Puisque tous les mutants sont tronqués uniquement en N-terminal, une amorce anti-sens s'hybridant dans le vecteur pLPC, dont la séquence est 5'gccaacctacaggtggggtc 3', a été utilisée pour la PCR. Le mutant $\Delta N26$ a été tronqué à l'aide de l'amorce sens suivant 5'gtcagaattcgccatggactacaaagacgatgacgacaagggcgggggcagcggtttctccaag 3'. Pour le mutant $\Delta N52$, la séquence de l'amorce sens est 5'gtcagaattcgccatggactacaaagacgatgacgacaagggcggggccatggaagatgaagag 3'. Finalement, le mutant $\Delta N79$ l'amorce utilisée est 5'gtcagaattcgccatggactacaaagacgatgacgacaagggcgtcctcaggagtgtcagcccc 3'. Toute les amorce sens possède une séquence Kozak minimale avant l'ATG. Le site de restriction pour EcoRI est souligné alors que la séquence de l'épitope flag est en caractère gras. Les produits PCR ont ensuite été digéré par les enzymes de restrictions EcoRI et XhoI afin d'être cloné dans les mêmes sites du vecteur rétroviral pLPC.

Gel d'électrophorèse en deux dimensions

50 μ g d'extraits totaux provenant de cellules U2OS transfecté avec pLPC-Flag CHES1L ont été déposés sur gel d'électrophorèse en gradient de pH non équilibré (NEPHGE) et ont été équilibrés pendant 6h à 200V de façon à séparer les protéines selon leur charge tel que décrit précédemment (252). Dans cette expérience, les gels NEPHGE

ont été préparés avec 1.6% et 0.4% (W/V) d'ampholytes 3.5-10 et 5-8, respectivement. Après avoir atteint l'équilibre, les protéines ont été séparées par SDS-PAGE standard et analysées par immunobuvardage. Lorsqu'indiqué, les extraits cellulaires ont été déphosphorylés avec 0.1U/ μ L de phosphatase alcaline (CIP, NEB).

Immunoprécipitation (IP)

Les cellules U2OS ont été transfectées tel que décrit dans le manuscrit et ont été récoltées 48h post-transfection. Au besoin, les cellules ont été traitées au MG132 (SIGMA), un inhibiteur du protéasome, 5 heures précédant la récolte à une concentration de 80 μ M. Au moment de la récolte, les cellules ont été lavées deux fois au PBS 1X et lysées à 10^7 cellules/mL dans le tampon d'IP (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM pyrophosphate de sodium, 1 mM β -glycérophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 0,1 mM PMSF, cocktail d'inhibiteur de protéase [Complete, Roche]) pendant 10 minutes sur glace. Les débris cellulaires ont ensuite été éliminés par centrifugation à 13 000 rpm à 4°C pendant 5 minutes. La concentration en protéines des différents extraits cellulaires a été quantifiée par la méthode de Bradford et 1mg de protéines ont été soumis à l'IP. Les IP ont été effectuées dans un volume total de 800 μ L. Pour immunoprécipiter CHES1, 20 μ L d'une solution 50% d'anticorps monoclonal anti-Flag de souris conjugués aux billes d'agarose (SIGMA) ont été ajoutés aux extraits et incubés pendant 1h30 à 4°C sur une roue tournante. Les IPs ont ensuite été lavées quatre fois avec 1mL de tampon de lyse complet et les protéines ont été éluées en incubant les échantillons pendant 45 minutes à température pièce avec 100 μ g/mL de peptide compétitif Flag (#F4799SIGMA). Par la suite, les échantillons ont été bouillis 5 minutes après avoir ajouté 1 volume de tampon SDS 2X (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycérol, 4% SDS et 10% 2-mercaptoethanol) et analysés par SDS-PAGE.

Pour immunoprécipiter p53, les lysats cellulaires ont tout d'abord été incubé 30 minutes à 4°C avec 75 µL d'une solution de billes de protéine A-sépharose à 50% afin d'éviter des interactions non-spécifiques. Ensuite, les lysats ont été débarrassés des billes et incubés avec un anticorps anti-p53 (#9282, 1 :200, cell signaling) pendant 1h30 à 4°C sur une roue tournante. 75 µL de billes de protéines A-sépharose ont à nouveau été ajoutés et incubées pour 45 minutes à 4°C sur une roue tournante. Les IPs ont été lavées tel que décrit et les billes ont été resuspendues dans 75 mL de tampon SDS 1X (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS et 5% 2-mercaptoethanol) et bouilli 5 minutes avant d'être analysé sur SDS-PAGE.

Spectrométrie de masse

Les échantillons soumis à la spectrométrie de masse proviennent de deux expériences indépendantes afin d'identifier les sites de phosphorylation. Dans un premier temps, des IPs ont été effectuées sur des cellules U2OS 48h post-transfection. Deuxièmement, des IPs ont été effectuées 4 jours post-sélection sur les fibroblastes normaux BJ^c infecté avec Flaf-CHES1L. Dans les deux cas, les IPs ont été effectués selon le protocole décrit ci-haut et les protéines éluées sans tampon SDS et non-bouillies ont été envoyées pour le séquençage de peptide au département de protéomique de l'institut de Recherche en immunologie et Cancérologie (IRIC) de l'université de Montréal.

Immunobuvardage

Afin de préparer les extraits cellulaires totaux, les cellules ont été recueillies par trypsinisation, lavées deux fois au PBS 1X, lysées dans 100 µL de tampon SDS et bouilli 5 minutes. Lorsqu'indiqué, les cellules ont été lysées directement dans le pétri avec 500 µL de tampon d'IP après avoir lavées les cellules deux fois au PBS 1X. Par la suite, les échantillons ont été bouillis 5 minutes après avoir ajouté 1 volume de tampon SDS 2X (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycérol, 4% SDS et 10% 2-mercaptoethanol) pour l'analyse

par SDS-PAGE tel qu'indiqué dans le manuscrit. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : anti-FOXN3 (1 :1000, CeMines, CO, USA), anti-phospho (Ser/Thr) ATM/ATR substrate (1:1000, cell signaling), anti-ubiquitine P4D1 (1:1000, cell signaling), anti-p53 #9282 (1:1000, cell signaling) et anti-p53 #1C12 (1:1000, cell signaling).