

Université de Montréal

**Rôle de la déubiquitinase BAP1
dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN**

par

Mehdi Ghram

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)
en biochimie

Décembre, 2010

© Mehdi Ghram.2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Rôle de la déubiquitinase BAP1
dans la réponse aux dommages à l'ADN

présenté par :

Mehdi Ghram

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Muriel Aubry
Président-rapporteur

Dr El Bachir Affar
Directeur de recherche

Dr Francis Rodier
Membre du jury

RÉSUMÉ

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui joue un rôle central dans divers processus biologiques. Elle peut être contrecarrée par les déubiquitinases (DUBs). "**BRCA1-Associated Protein 1**" (BAP1) est une déubiquitinase, qui fait partie de complexes multiprotéiques, possédant une fonction de suppression tumorale ainsi qu'un potentiel anti-métastatique. De plus, BAP1 est phosphorylée suite aux dommages à l'ADN par les kinases ATM/ATR.

En nous basant sur ces données, nous avons purifié les protéines associées à BAP1 dans des conditions de stress génotoxique. Bien que la composition du complexe et l'activité DUB semblent inchangées, nous avons pu identifier des changements critiques dans les niveaux et les sites de phosphorylation, confirmant la régulation de BAP1 suite aux dommages à l'ADN.

En déplétant BAP1 par ARNi et en utilisant des mutants dominants négatifs, nous avons obtenu des résultats suggérant que suite au stress génotoxique, cette DUB est requise pour prolonger le point de contrôle en G2/M et ce, en retardant la reprise du cycle cellulaire. D'un autre côté, l'expression de BAP1 dans des cellules cancéreuses qui en sont déficientes restaure une ploïdie normale et diminue la fréquence d'aberrations nucléaires, suggérant que cette protéine joue un rôle dans la stabilité génomique.

Nos résultats suggèrent fortement que BAP1 joue un rôle dans la réponse des cellules au stress génotoxique et la stabilité génomique. Nos travaux permettront ainsi d'identifier et de caractériser les voies de signalisation cellulaire régulant l'activité et la fonction de BAP1 durant les périodes d'exposition à des agents qui endommagent l'ADN. Les connaissances acquises seront donc d'une valeur tangible pour notre compréhension de la mutagenèse induite par des agents carcinogènes, un déterminant clé de la formation des tumeurs.

Mots clés:

BAP1

Cancer

Dommmages à l'ADN

Point de contrôle en G2/M

Suppresseur de tumeur

ABSTRACT

Ubiquitination is a reversible, covalent post-translational modification that regulates protein function and as such plays crucial roles in a wide range of physiological processes. Importantly, gain- or loss-of-function mutations in components of the ubiquitin system have been causally linked to tumorigenesis. The reverse reaction of ubiquitination is catalyzed by deubiquitinases (DUBs), a family of enzymes that removes ubiquitin from proteins.

BRCA1-Associated Protein 1 (BAP1) is a deubiquitinase known to be a tumor suppressor and anti-metastatic protein since deletions and rearrangements are observed in a wide range of tumors. However, little is known about how BAP1 works into the cells. Here, we show that BAP1 is hyperphosphorylated after DNA damage by gamma radiations and ultraviolet light, probably by ATM and/or ATR. Moreover, we found that BAP1 depletion cause a defect in the maintenance of the G2/M checkpoint after gamma radiation, suggesting that BAP1 is required to maintain the arrest after DNA damage. This delay is important to allow DNA repair and to prevent genomic instability. Consistently, we found that BAP1 expression in BAP1 deficient cells restore normal diploidy and prevent nuclear aberrations, suggesting that BAP1 links DNA damage induced checkpoint regulation to genomic stability: two important processes for carcinogenesis.

These findings provide new insights into the role of deubiquitination in cell signaling and neoplastic transformation.

Key words:

BAP1

Cancer

DNA damage

G2/M checkpoint

Tumor suppressor

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xii
DÉDICACES	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
AVANT-PROPOS	xv
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1 L'ubiquitination	2
1.1.1 L'ubiquitine	2
1.1.2 Les différents types d'ubiquitination	2
1.1.3 Les rôles multiples de l'ubiquitination	4
1.1.4 Cascade enzymatique de l'ubiquitination	4
1.1.4.1 Enzymes d'activation E1s.....	5
1.1.4.2 Enzymes de conjugaison E2s.....	5
1.1.4.3 Ubiquitine-ligases E3s	5
1.1.4.3.1 Les E3s possédant un domaine HECT	6
1.1.4.3.2 Les E3s à RING finger:.....	6
1.1.4.4 Enzymes d'élongation E4s	6
1.1.4.5 Exceptions à la voie classique de l'ubiquitination.....	7
1.1.5 Régulation du processus l'ubiquitination	7
1.1.5.1 Régulation générale.....	7
1.1.5.2 Régulation par des protéines dites "Ubiquitine-like"	7
1.1.5.3 La déubiquitination	8
1.2 Les déubiquitinases	8
1.2.1 Niveaux d'Action des DUBs	8

1.2.1.1	La dégradation des précurseurs de l'ubiquitine (génération de monomères d'ubiquitine libres)	8
1.2.1.2	La correction des substrats ubiquitinés de façon inappropriée	9
1.2.1.3	La libération des substrats polyubiquitinés pour permettre la dégradation par le protéasome 26S	9
1.2.1.4	La séparation de la chaîne de polyubiquitine du substrat polyubiquitiné	10
1.2.1.5	La dégradation de la chaîne de polyubiquitine: recyclage de l'ubiquitine.....	10
1.2.2	Les différentes classes de DUBs.....	10
1.2.2.1	Les "Ubiquitin C-Terminal Hydrolases" (UCH).....	11
1.2.2.2	Les "Ubiquitin-Specific proteases" (USPs)	12
1.2.2.3	Les "Ovarian Tumor domain DUBs" (OTU).....	12
1.2.2.4	Les DUBs à domaine Josephin (MJD).....	12
1.2.2.5	Les métalloprotéases à domaine JAMM.....	12
1.2.3	Modes de régulation des DUBs.....	13
1.2.4	Fonctions biologiques des DUBs.....	14
1.3	BRCA1 Associated Protein 1 : BAP1	16
1.3.1	BAP1 est un suppresseur de tumeur	17
1.3.2	BAP1 appartient à des complexes multiprotéiques à vocation transcriptionnelle.....	18
1.3.3	Un rôle probable de BAP1 dans la réponse aux dommages à l'ADN	19
1.3.3.1	Les types de dommages et leurs origines.....	20
1.3.3.1.1	Les dommages d'origine endogène	20
1.3.3.1.2	Les dommages d'origine environnementale.....	21
1.3.3.2	Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN.....	23
1.3.3.2.1	Détection des dommages et activation des points de contrôle.....	23
1.3.3.2.2	La réparation d'ADN:.....	30
1.3.3.2.3	Apoptose	34
1.3.3.3	BAP1 est modifié suite aux dommages à l'ADN	36
1.4	Hypothèse et objectifs.....	37
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	39
2.1.	Plasmides et anticorps.....	40

2.2.	Culture cellulaire, ARN interférence et immunobuvardage:	40
2.3.	Identification des sites de phosphorylation de BAP1 et des protéines qui lui sont associées:	41
2.4.	Essai d'interaction avec la sonde ubiquitinée:.....	42
2.5.	Marquage par immunofluorescence:.....	43
2.6.	Analyse du cycle cellulaire et essais de cytométrie en flux:.....	43
3.	RÉSULTATS	45
3.1.	BAP1 est phosphorylé suite au stress génotoxique et cette phosphorylation se prolonge à des intervalles de temps longs.....	46
3.2.	BAP1 est hyperphosphorylé en réponse aux dommages à l'ADN	47
3.3.	Le stress génotoxique n'altère pas la composition des complexes protéiques qui contiennent BAP1	49
3.4.	Les dommages à l'ADN n'affectent pas la disponibilité de BAP1 et sa liaison à l'ubiquitine.....	52
3.5.	BAP1 régule la maintenance de l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire suite aux radiations ionisantes	54
3.6.	Le rôle de BAP1 dans la maintenance du point de contrôle en G2/M serait indépendant de l'interaction avec "Host Cell Factor	56
3.7.	Un rôle de BAP1 dans la réponse des cellules aux rayons UVC	58
3.8.	L'expression de BAP1 restaure partiellement une ploïdie normale dans les cellules H226.....	62
3.9.	BAP1 est capable de corriger, d'une manière partielle, les aberrations nucléaires et l'instabilité génomique sévère des cellules H226.....	65
4.	DISCUSSION	68
5.	CONCLUSIONS.....	79
6.	BIBLIOGRAPHIE	83

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I. Exemple de déubiquitinasés listés avec leurs substrats ainsi que les processus cellulaires dans lesquels elles sont impliquées 15

Tableau II. Exemples de stress génotoxiques naturels ou artificiels et dommages occasionnés sur l'ADN 21

Tableau III. Classification des gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire selon leur fonction. 26

Chapitre 4

Tableau IV. Les gènes dérégulés par la déplétion de BAP1 sont impliqués dans des processus qui participent à la régulation de la réponse des cellules aux dommages à l'ADN 76

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1. Structure de l'ubiquitine.....	3
Figure 2. Les différents types d'ubiquitination des protéines.....	3
Figure 3. Les différentes étapes de l'ubiquitination des protéines.	5
Figure 4. Fonctions de DUBs dans le système ubiquitine	9
Figure 5. Structure tridimensionnelle des domaines catalytiques des cinq classes de déubiquitinases	11
Figure 6. Alignement des séquences des quatre membres de la famille des UCHs	11
Figure 7. Schéma représentant la séquence de BAP1 avec les différentes régions qui la constituent..	17
Figure 8. Effet anti tumoral de BAP1.	18
Figure 9. Organisation conceptuelle de la transduction de signal lors de la réponse aux dommages à l'ADN.	24
Figure 10. Vue globale des points de contrôle du cycle cellulaire induits par les dommages à l'ADN.	28
Figure 11. Rôle des complexes CDKs-Cyclines dans la régulation des complexes RBs-E2Fs et l'impact sur l'expression des gènes impliqués dans les transitions du cycle cellulaire	29
Figure 12. Rôle de FoxM1 dans la régulation transcriptionnelle de la progression G2/M du cycle cellulaire	30
Figure 13. Représentation simplifiée du mécanisme de recombinaison homologue.....	32
Figure 14. Représentation simplifiée du mécanisme de NHEJ.....	34
Figure 15. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose et interventions de p53	35

Chapitre 2

Figure 16. Stratégie pour la purification des protéines associées à BAP1 dans les conditions de stress génotoxique.....	42
---	----

Chapitre 3

Figure 17. La phosphorylation de BAP1 est induite par le stress génotoxique et se prolonge à des intervalles de temps longs.....	47
--	----

Figure 18. BAP1 est hyper-phosphorylé suite aux dommages à l'ADN.....	48
---	----

Figure 19. Le stress génotoxique n'altère pas la composition des complexes protéiques qui contiennent BAP1.	51
--	----

Figure 20. Les dommages à l'ADN n'affectent pas la disponibilité de BAP1 et sa liaison à l'ubiquitine.....	53
--	----

Figure 21. La déplétion de BAP1 cause un défaut dans la maintenance du point de contrôle du cycle cellulaire en phase G2 suite aux radiations ionisantes	55
--	----

Figure 22. Le rôle de BAP1 dans le maintien de l'arrêt en G2 après les radiations ionisantes est indépendant de l'interaction avec HCF.....	57
---	----

Figure 23. La déplétion de BAP1 dans les cellules U2OS n'a pas un effet notable sur le point de contrôle en G1/S, intra-S et l'induction de l'arrêt en G2/M suite à un traitement aux radiations UVC.....	59
---	----

Figure 24. La reconstitution des cellules H226 BAP1 ^{-/-} par BAP1 sauvage et non pas par sa forme inactive induit une augmentation du niveau basal de la protéine Rb ainsi qu'une activation plus prolongée de la forme phosphorylée de la variante H2AX suite aux UVC	61
--	----

Figure 25. L'expression de BAP1 restaure partiellement une ploïdie normale dans les cellules H226 aneuploïdes.....	64
--	----

Figure 26. Les cellules H226 présentent des aberrations nucléaires et une instabilité génomique sévère pouvant être corrigés partiellement par l'expression stable de BAP1.	66
--	----

Chapitre 4

Figure 27. BAP1 régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et la régulation du cycle cellulaire.....	76
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BAP1	Protéine associée à BRCA1 (BRCA1 Associated Protein 1)
BRCA1	gène du cancer du sein 1 (breast cancer gene 1)
BrdU	bromodéoxyuridine
CDC25	protéine du cycle de division cellulaire 25 (cell division cycle protein 25)
CDK	kinase dépendante de cycline (cyclin-dependant kinase)
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique (ethylene diaminetetraacetate)
FACS	triage cellulaire activé par fluorescence (fluorescence-activated cell sorting)
FBS	sérum de veau foetal (fetal bovine serum)
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
RT-PCR	réaction en chaîne par polymérase-transcription inverse (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
shRNA	petit ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA)
siRNA	petit ARN interférent (small interfering RNA)
WT type	sauvage (wild-type)

DÉDICACES

*A mes chers parents, à ma femme Kaouther
A mes sœurs chéries, à tous mes "Frères"*

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr El bachir Affar. Merci Bachir d'avoir contribué à ma formation. Peut être que c'est une carrière qui vient de s'amorcer grâce à toi.

Je ne sais pas ce qu'aurait été ma maîtrise sans tous mes amis du laboratoire. Je remercie donc tous les membres de notre équipe sans exception, aucune. Je les remercie pour toutes les situations où nous avons ri, pour tous les moments difficiles que nous avons traversés ensemble, pour toutes les discussions que nous avons eues, à propos de science et autre et tous les conseils dont j'ai pu bénéficier pendant les deux années de mon projet.

Je remercie Driss el Kébir et Mohamed Abdouh, deux scientifiques brillants dont l'avenir sera probablement prometteur. Je les remercie pour leurs précieux conseils et suggestions pertinentes.

Enfin, je n'oublie pas tous ceux qui, au centre de recherche comme à l'université de Montréal, ont été gentils et serviables avec moi. Ces qualités sont si précieuses mais rares ces temps-ci.

AVANT-PROPOS

Les statistiques le prouvent: un homme sur deux et une femme sur trois développeront au moins un cancer au cours de leur vie. La première cause de mortalité dans la plupart des pays développés est le cancer. Il n'y a pas un parmi nous qui ne connaît une ou plusieurs personnes, dans son entourage, qui ont, ou qui ont eu un cancer. Je fais partie de ceux qui ont perdu un être cher à la suite d'une tumeur au cerveau. A partir de cet instant, j'ai voulu me lancer dans la recherche fondamentale afin de participer, un tant soit peu, aux efforts gigantesques mis en œuvre pour essayer de comprendre les mécanismes qui gouvernent la carcinogenèse. Le laboratoire du Dr Affar s'intéresse de près à un suppresseur de tumeur très peu connu, mais qui est muté dans bien des cancers. Son équipe utilise des approches de biochimie et de biologie moléculaire et cellulaire afin de comprendre les bases moléculaires et les voies de signalisations qui gouvernent la fonction de cette déubiquitinase. La finalité n'étant pas uniquement de comprendre, mais de développer des stratégies thérapeutiques de plus en plus adaptés, spécifiques et donc efficaces face à cette multitude de cancers si différents les uns des autres.

1.REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 L'ubiquitination

L'émergence de la modification des protéines par l'ubiquitine, et par ce qu'on appelle les "Ubiquitine-like", comme un processus critique de régulation, a été d'une importance capitale dans l'étude des différents aspects de la vie cellulaire durant les quelques décennies passées. D'autant plus que le prix Nobel en chimie a été accordé pour la découverte du système Ubiquitine-protéasome et ce, en 2004. A partir de là, les découvertes touchant les protéines ubiquitinées et des enzymes impliquées dans le système ubiquitine ne cessent de se succéder, révélant de plus en plus un rôle extrêmement important de cette modification dans la vie de la cellule.

1.1.1 L'ubiquitine

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés, décrite pour la première fois en 1975 (1). Elle se présente sous forme globulaire et est trouvée soit en tant que monomère libre dans le cytosol, soit liée de façon covalente (liaison amide) avec elle-même ou avec d'autres protéines (2). L'ubiquitine a d'abord été mise en évidence pour sa participation à la protéolyse réalisée par le protéasome.

L'ubiquitine possède une structure relativement complexe qui permet des interactions protéines-protéines (3). Pour certains, l'ubiquitination constituerait une modification post-traductionnelle des protéines aussi importante que la phosphorylation (4). Ainsi, outre son rôle dans la dégradation protéasomique, l'ubiquitine participe à la transduction du signal qui régule le cycle cellulaire, l'endocytose, la transcription, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la réponse immune (3, 5).

1.1.2 Les différents types d'ubiquitination

L'ubiquitine est conjuguée aux protéines sur lesquelles elle se fixe par une liaison peptidique entre l'extrémité carboxy-terminale d'un de ses résidus glycine (G76) et l'extrémité amino-terminale des lysines acceptrices portées par les protéines cibles (2).

L'ubiquitine possède elle-même 7 résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) (Figure 1) qui, chacune, permet son auto-polymérisation et la formation de chaînes de différents types.

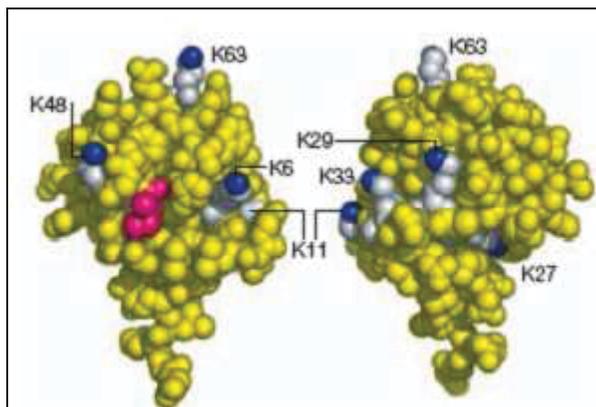


Figure 1. Structure de l'ubiquitine. Deux faces de l'ubiquitine sont représentées. Les 7 résidus lysines sont représentés en blanc. Tirée de (6).

L'ubiquitination des protéines peut être de différents types (Figure 2). Ainsi, est observée la fixation covalente d'un seul résidu ubiquitine (monoubiquitination et monoubiquitination multiple) ou la conjugaison de chaînes de résidus ubiquitine (polyubiquitination) (7).

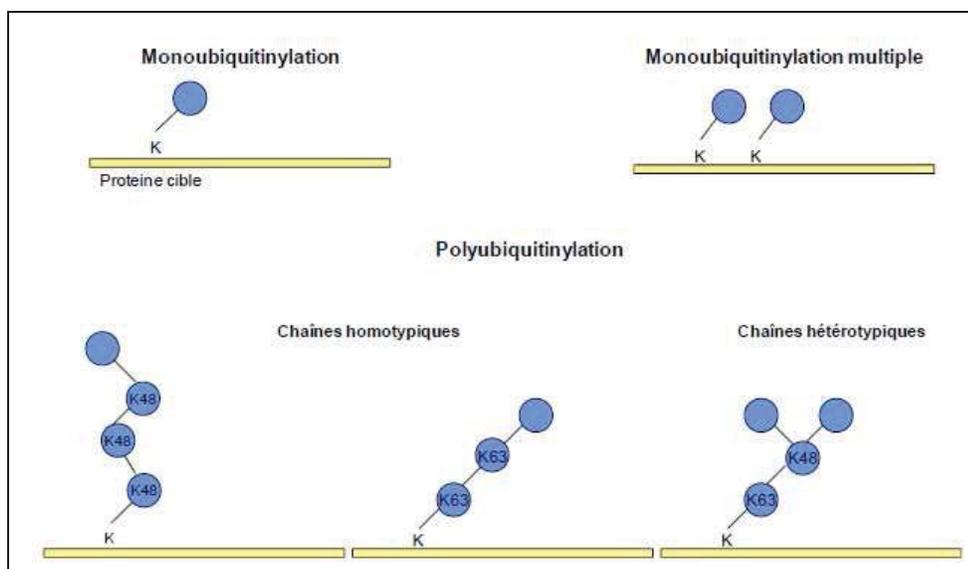


Figure 2. Les différents types d'ubiquitination des protéines. Tirée de (7).

Dans une chaîne polyubiquitine, chaque ubiquitine se lie à la précédente en établissant un pont peptidique entre son résidu glycine carboxy-terminal (G76) et un résidu lysine (K48, K63...) de l'ubiquitine précédente. Les chaînes les plus représentées et étudiées dans les cellules sont les chaînes K48 (8).

1.1.3 Les rôles multiples de l'ubiquitination

La fixation d'une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitination) constitue un signal important dans la signalisation intracellulaire en participant aux processus d'endocytose (exemple l'internalisation des récepteurs à tyrosine-kinase) et aux phénomènes d'adressage des protéines entre les différents compartiments cellulaires (5). La monoubiquitination est aussi impliquée dans la régulation de la compaction de la chromatine et dans la réparation de l'ADN (ubiquitination des différents acteurs de la réparation, par exemple PCNA [*Proliferating Cell Nuclear Antigen*]) (9).

Dans le cas d'une chaîne poly-ubiquitinée, la disposition des résidus de l'ubiquitine dans la chaîne n'est pas anodine et le signal ainsi constitué modifie fortement le devenir de la protéine porteuse de la chaîne. Ainsi, les chaînes K48 et K29 sont impliquées dans l'adressage des protéines pour la dégradation protéasomique. Une chaîne tétra-ubiquitine K48 est le signal minimal pour une reconnaissance efficace par le protéasome. Néanmoins, il semble que les chaînes plus longues confèrent un avantage significatif, le principal bénéfice étant certainement une augmentation du temps de résidence sur le protéasome, plutôt qu'une augmentation de l'affinité du substrat pour le protéasome. Les chaînes K11 et K63 sont, quant à elles, impliquées dans d'autres processus comme la réparation des lésions de l'ADN, l'endocytose, ou la régulation d'activités enzymatiques (10).

1.1.4 Cascade enzymatique de l'ubiquitination

L'ubiquitination des protéines, présentée sur la figure 3, requiert l'activité séquentielle de plusieurs types d'enzyme (11).

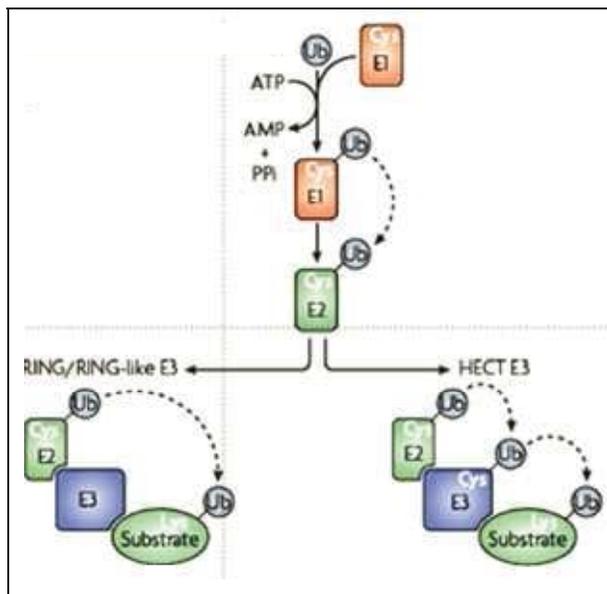


Figure 3. Les différentes étapes de l'ubiquitination des protéines. Tirée de (12).

1.1.4.1 Enzymes d'activation E1s

L'ubiquitine est tout d'abord activée avec formation d'une liaison thioester avec une enzyme d'activation (*ubiquitin-activating enzyme* ou E1) en présence d'ATP. Chez les Eucaryotes, la réaction d'activation se déroule en deux étapes : la formation initiale d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate est suivie de la réaction de cet intermédiaire avec le résidu cystéine de l'E1 pour former un pont thioester. L'ubiquitine ainsi activée est ensuite transférée aux enzymes de type E2 (13).

1.1.4.2 Enzymes de conjugaison E2s

Au cours d'une réaction de transthioylation, l'ubiquitine activée est transférée de l'enzyme E1 vers un résidu cystéine d'une enzyme de conjugaison E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*). Chez les Mammifères, plus d'une centaine de protéines ont été identifiées comme membre de la famille E2. Toutes ces enzymes possèdent un domaine conservé d'environ 150 acides aminés contenant le résidu cystéine nécessaire à leur activité (13).

1.1.4.3 Ubiquitine-ligases E3s

L'étape suivante dans la cascade d'ubiquitination des protéines correspond au recrutement spécifique de la protéine à dégrader et au transfert de l'ubiquitine sur cette

protéine substrat. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille E3 ou ubiquitine-ligases (8).

L'ubiquitine ligase est une protéine ou un complexe protéique capable de se lier à l'enzyme E2 et à la protéine à dégrader. L'interaction avec le substrat peut être directe ou peut se faire par l'intermédiaire des protéines adaptatrices. On distingue deux grandes familles d'enzymes E3 :

1.1.4.3.1 Les E3s possédant un domaine HECT

(*Homologous to the E6-AP Carboxy-Terminus*) : identique au cas de E6-AP, l'ubiquitine ligase de p53, l'enzyme E3 possède un rôle catalytique. L'ubiquitine activée est transférée de l'E2 sur un résidu cystéine de l'enzyme E3 avant d'être conjuguée à un groupement amino-terminal d'une lysine de la protéine cible. L'extrémité NH₂-terminale de ces enzymes E3 est très variable et est responsable de la reconnaissance spécifique du substrat (9).

1.1.4.3.2 Les E3s à RING finger

L'enzyme E3 sert de support assurant le rapprochement de l'enzyme E2 porteuse de l'ubiquitine activée et le substrat, ce qui permet un transfert direct et efficace de la molécule d'ubiquitine sur la protéine à dégrader. Le motif "*RING finger*" est indispensable pour la fixation à l'enzyme de type E2. Parmi les E3s à RING finger, trois types de complexes supramoléculaires (SCF, CBC, APC/C) sont bien connus et présentent des similitudes architecturales et fonctionnelles (3).

L'ubiquitination nécessite la fixation de la protéine cible à l'ubiquitine ligase appropriée. Plusieurs modes de reconnaissance par les E3s ligases sont désormais bien caractérisés. Parmi ceux-ci, la phosphorylation du substrat est le mécanisme le plus décrit (par exemple les cyclines D et E). D'autres modes de reconnaissance ont été rapportés comme les boîtes de destruction des cyclines 1 et B (2, 12).

1.1.4.4 Enzymes d'élongation E4s

Pour de nombreuses protéines, la chaîne de polyubiquitine est formée par une série de cycles identiques impliquant successivement les enzymes E1, E2 et E3, jusqu'à l'obtention d'un motif suffisant pour permettre la dégradation par le protéasome. En revanche, pour d'autres protéines à dégrader, la formation de la chaîne implique

l'intervention d'une autre famille d'enzymes, appelées enzymes d'élongation ou E4, exemple l'enzyme de type U-box UFD2a (13, 14).

1.1.4.5 Exceptions à la voie classique de l'ubiquitination

Quelques exceptions ont été décrites quant au mode classique d'ubiquitination en cascade. Il existe par exemple des enzymes d'activation analogues de l'enzyme E1 qui assurent l'activation spécifique des protéines "ubiquitine-like". Dans d'autres cas, l'ubiquitine est activée par une enzyme hybride E1-E2. Il existe de la même façon des enzymes hybrides de type E2-E3 (15). Pour certaines protéines, la fixation de la première molécule d'ubiquitine s'effectue non pas sur un résidu lysine interne au substrat mais au niveau de l'extrémité amino-terminale comme dans le cas de LMP1 ou MyoD (16).

1.1.5 Régulation du processus d'ubiquitination

1.1.5.1 Régulation générale

Le système ubiquitine peut être régulé soit au niveau de l'ubiquitination, soit au niveau de l'activité du protéasome. Ce système intervenant dans une multitude de processus cellulaires, la régulation est généralement très spécifique. Néanmoins, une régulation plus générale a été rapportée. On note une modulation de l'expression ou de la stabilité des différents composants de la voie ubiquitine ou spécifiquement du protéasome.

1.1.5.2 Régulation par des protéines dites "Ubiquitine-like"

Les enzymes et les substrats de la voie d'ubiquitination sont modifiés par des protéines dites "ubiquitine-like" (protéines structurellement et fonctionnellement proches de l'ubiquitine). Dans le cas des enzymes de type E1, E2 et E3, la fixation des protéines ubiquitine-like affecte leur activité ou leur stabilité. Par ailleurs, la fixation de ces protéines sur les substrats modifie leur capacité à être dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (15). Les multiples rôles des protéines "ubiquitine-like" sont actuellement en cours de découverte mais leur importance biologique est déjà parfaitement reconnue. Un des mécanismes régulateurs les plus décrits est l'attachement de molécules "ubiquitine-like" comme SUMO (*Small Ub-related MOdifier*), à la place de l'ubiquitine. Par exemple, alors que l'activation de NF- κ B est généralement associée à l'ubiquitination et à la destruction de son inhibiteur naturel I κ B α , la sumoylation de

I κ B α stabilise la protéine (non dégradation par non reconnaissance par les enzymes d'ubiquitination) et évite l'activation de NF- κ B. De façon similaire, à l'état basal, la protéine p53 est rapidement ubiquitinée et dégradée par le protéasome *via* la E3 ligase MDM2. En revanche, en cas de stress génotoxique, p53 peut être SUMOylée et conduit à la relocalisation de la protéine au niveau de ses sites d'activation de la transcription. Il est possible que l'antagonisme mutuel entre SUMO et ubiquitine résulte aussi en une molécule se partageant entre deux pools, stable et instable, entre différents compartiments cellulaires (17).

1.1.5.3 La déubiquitination

Par analogie aux autres modifications post-traductionnelles, l'ubiquitination est une réaction réversible et les enzymes qui peuvent enlever l'ubiquitine sont appelées déubiquitinases (DUBs). Le paragraphe suivant passera en revue les différentes familles de déubiquitinases, leur mode d'action ainsi que leur implication dans les différents processus biologiques.

1.2 Les déubiquitinases

Puisqu'elles sont capables de cliver l'ubiquitine, les DUBs sont des protéases. Il existe plusieurs familles qui jouent un rôle déterminant dans l'efficacité de la machinerie d'ubiquitination, d'autant qu'elles permettent de recycler l'ubiquitine afin de maintenir un pool d'ubiquitine libre intracellulaire nécessaire au maintien de la protéolyse. Elles sont donc essentielles dans le contrôle et le devenir des substrats ubiquitinés.

1.2.1 Niveaux d'Action des DUBs

Les enzymes de déubiquitination possèdent de multiples rôles biologiques (Figure 4) parmi lesquels on distingue :

1.2.1.1 La dégradation des précurseurs de l'ubiquitine (génération de monomères d'ubiquitine libres)

Les molécules d'ubiquitine ne sont généralement pas synthétisées dans les cellules sous forme de monomères libres mais plutôt en tant que multimères circulaires et en tant que protéines de fusion avec les ribosomes. Ainsi les DUBs sont essentielles pour la génération de monomères d'ubiquitine libres à partir des précurseurs circulaires et des

fusions aux protéines ribosomales, c'est le cas de plusieurs DUB appartenant à la classe des USPs (18).

1.2.1.2 La correction des substrats ubiquitinés de façon inappropriée

Les enzymes de déubiquitination comme Ap-UCH exercent aussi de fonction de correction en éliminant les chaînes d'ubiquitine conjuguées à des substrats par erreur (19).

1.2.1.3 La libération des substrats polyubiquitinés pour permettre la dégradation par le protéasome 26S

Le complexe régulateur 19S du protéasome possède une activité de déubiquitination qui permet la libération des chaînes polyubiquitinées à partir des substrats à dégrader (15, 18).

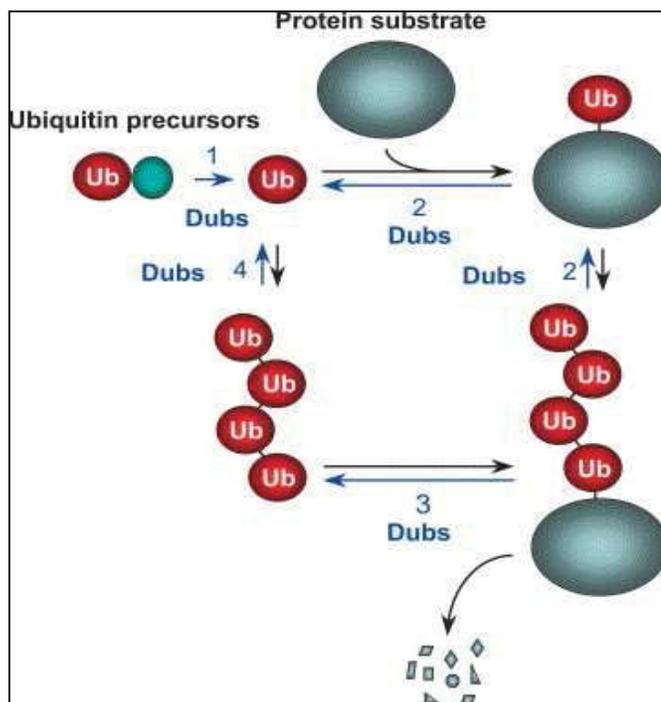


Figure 4. Fonctions de DUBs dans le système ubiquitine. 1: maturation de l'ubiquitine. 2: clivage du lien substrat-monoubiquitine et régulation de la chaîne de polyubiquitine. 3. séparation de la chaîne de polyubiquitine du substrat polyubiquitiné et 4: recyclage de l'ubiquitine. Tirée de (20).

1.2.1.4 La séparation de la chaîne de polyubiquitine du substrat polyubiquitiné

Les DUBs peuvent ainsi contrecarrer la polyubiquitination de substrat et ainsi réguler leur stabilité ou leur activité. Les exemples ne manquent pas pour ce rôle majeur des DUB, à l'image de USP7 qui stabilise p53 et empêche sa dégradation par MDM2 (20).

1.2.1.5 La dégradation de la chaîne de polyubiquitine: recyclage de l'ubiquitine

Cette réaction, qui se fait par des enzymes comme Ubp14, permet de libérer un pool libre de monoubiquitine pouvant être utilisé par le système ubiquitine.

1.2.2 Les différentes classes de DUBs

Les déubiquitinases appartiennent à la superfamille des protéases, rassemblant plus de 560 membres dans le génome humain (20). En nous basant sur le mécanisme de catalyse, les protéases sont divisées en cinq classes: aspartique-protéases, métallo-protéases, sérine-protéases, thréonine-protéases et cystéine-protéases. Deux classes de protéases: les métallo-protéases et les cystéine-protéases incluent les DUBs, avec une abondance remarquable de la deuxième classe (20).

Par définition, l'activité enzymatique des cystéine-protéases se base sur un groupement thiol d'une cystéine du site actif. La déprotonation de cette cystéine est assistée par un résidu histidine adjacent. Ce dernier étant polarisé par un résidu aspartate. Ces trois résidus forment ce qu'on appelle la triade catalytique. A la différence des cystéine-protéases, les métallo-protéases utilisent généralement un ion Zn^{2+} , et leur triade catalytique est formée par un aspartate et deux histidines (21).

En nous basant sur leur domaine Ub-protease, les cystein-proteases peuvent être subdivisées en quatre sous-classes: les ubiquitin-specific proteases (USP), les Ubiquitin C-terminal hydrolases (UCH), les Otubain proteases (OTU) et les Machado-joseph disease proteases (MJD). Toutes les déubiquitinases qui sont des métallo-protéases possèdent un domaine Ub-protease appelé JAMM (JAB1/MPN/Mov34 métalloenzyme). Les structures et les domaines catalytiques des différentes DUBs révèlent une diversité impressionnante de ces enzymes qui, découvertes à ce jour, se chiffrent à peu près à une centaine (Figure 5).

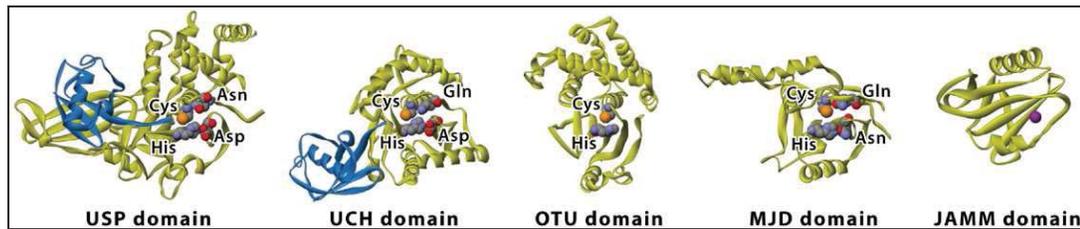


Figure 5. Structure tridimensionnelle des domaines catalytiques des cinq classes de déubiquitines (jaune) avec l'ubiquitine (bleu). Tirée de (22).

1.2.2.1 Les "Ubiquitin C-Terminal Hydrolases" (UCH)

En prenant l'exemple de UCH-L1 et -L3, le domaine catalytique UCH est constitué de 230 acides aminés. Les humains possèdent 4 UCHs alors que la levure n'en possède qu'une seule (23). On pensait que les UCHs sont exclusivement impliqués dans la maturation de l'ubiquitine ou son recyclage mais il est démontré que leur rôle ne se limite pas à ces processus. Chez la drosophile, l'UCH peut cliver une chaîne de polyubiquitine d'une protéine polyubiquitinée (24).

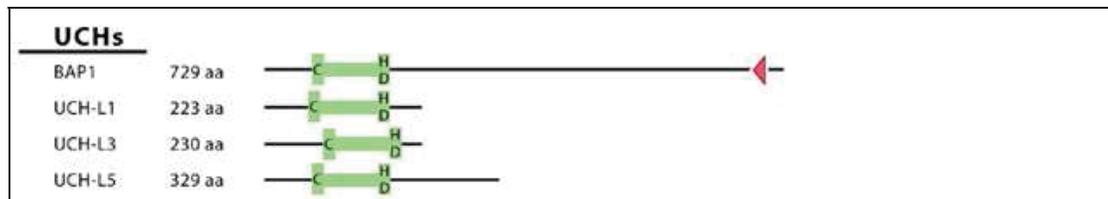


Figure 6. Alignement des séquences des quatre membres de la famille des UCHs. En vert, le domaine UCH et les lettres C, H et D indiquent les résidus formant la triade catalytique. En rouge, la séquence de localisation nucléaire de la protéine BAP1. Adaptée de (22).

UCH-L5 et BAP1 possèdent une extension en C-terminal: UCH-L5 contient aux alentours de 100 acides aminés additionnels à l'extrémité C-terminal. Cette région la lie au protéasome quand elle est impliquée dans la séparation de la chaîne de polyubiquitine des protéines qui seront dégradées (25). BAP1 contient une extension unique de 500 acides aminés (Figure 6), comprenant un signal de localisation nucléaire et un domaine "coiled coil" responsable des interactions protéines-protéines (26). Cette protéine sera passée en revue avec plus de détails dans les chapitres suivants.

1.2.2.2 Les "Ubiquitin-Specific proteases" (USPs)

Les USPs chez la levure (UBP) se chiffrent à 16 alors que le nombre chez l'Humain dépasse 50. Ils constituent la classe la plus abondante de DUBs connues à ce jour (22). La plupart des USPs contiennent un domaine catalytique avec des insertions ou des extensions en N ou C-terminal conférant à l'enzyme la capacité d'opérer des interactions protéine-protéine indispensable à la régulation de leur activité. On peut citer l'exemple des domaines UBA, MATH ou Rhodanese chez la levure (43).

1.2.2.3 Les déubiquitinases possédant un domaine OTU (Ovarian Tumor domain)

Les DUBs à domaine OTU ont été identifiés pour la première fois sur la base de leur homologie avec le gène de tumeur ovarienne impliqué dans le développement des ovaires des drosophiles (27). Le génome de la levure code pour deux protéines à domaine OTU alors que celui de l'Humain code pour 14. Des études subséquentes ont démontré que plusieurs protéines à domaine OTU possèdent une activité déubiquitinase (28). Les études récentes indiquent que le domaine OTU est composé de cinq feuillets β en "sandwich" entre des domaines à hélice α dont la taille varie d'une protéine à une autre (29).

1.2.2.4 Les déubiquitinases à domaine Josephin (MJD)

La protéine Ataxine-3 possédant un domaine MJD est une protéine impliquée dans l'ataxie de type 3, un désordre neurodégénératif spinocérébral. Cette protéine est la plus étudiée parmi les quatre membres de la famille des protéines à MJD (30). La structure du domaine MJD de la protéine Ataxine-3 a été résolue par résonance magnétique nucléaire et ressemble remarquablement au domaine UCH, et l'activité catalytique de cette protéine a été liée spécifiquement à la correction des chaînes de polyubiquitine K63 (31).

1.2.2.5 Les métalloprotéases à domaine JAMM

Quatre membres de cette famille sont connus à ce jour. Trois d'entre eux sont connus pour agir sur des substrats ubiquitinés (32-35), et l'autre agit sur les protéines modifiées par l'"ubiquitine-like" Nedd8 (36). Récemment, la protéine AMSH-like (Associated Molecule with the SH3 domain of STAM) a été résolue par cristallographie avec une

molécule de bi-ubiquitine à K63 (37). AMSH-LP est une DUB qui opère dans le trafic vésiculaire et clive spécifiquement les chaînes de polyubiquitine K63. Cette structure est la première qui a été résolue avec une chaîne de polyubiquitine et ceci a permis de montrer la liaison sélective des DUBs AMSH. L'AMSH présente deux ions de zinc, l'un est impliqué dans la catalyse, et l'autre fait partie d'une insertion qui forme un motif de reconnaissance de l'ubiquitine proximale de la bi-ubiquitine K63. D'autres protéases à domaine JAMM ne présentent pas de spécificité à l'égard de la chaîne de polyubiquitine K63 du fait de l'absence des insertions spécifiques qu'on retrouve chez les AMSH.

1.2.3 Modes de régulation des DUBs

A la différence de beaucoup de protéases, par exemple les caspases, qui sont traduites sous forme de précurseurs inactifs, les DUBs sont généralement produites sous la forme active. Les analyses structurales indiquent que les triades catalytiques des UCHs et des USPs entrent dans une conformation active seulement après la fixation à l'ubiquitine. Ceci préviendrait éventuellement une activité protéase non spécifique. Néanmoins, de plus en plus d'études mettent en évidence de nouveaux mécanismes de régulation des DUBs, de plus en plus complexes.

L'incorporation des DUBs dans des complexes multiprotéiques semble être un mécanisme régulateur de l'activité de plusieurs DUBs. Par Exemple, l'activité de la POH1 (DUB à domaine JAMM) dépend de son incorporation dans le protéasome 19S (38). Similairement, le signalosome COP9 régule l'activité de CSN5 (39). La même observation, peut être faite concernant USP14 qui dépend de l'activité du protéasome 26S (40). L'interaction des DUBs avec des cofacteurs semble, pour certaines protéines, indispensable à leur activité enzymatique. L'activité d'USP7 augmente considérablement quand cette dernière se lie à son cofacteur GMPS chez la drosophile (41).

La régulation de la stabilité des DUBs, que ce soit par le protéasome 26S ou par le clivage durant l'apoptose semble être un autre mécanisme de régulation très important pour beaucoup DUBs (43). La régulation translationnelle des gènes codant pour certaines DUBs peut s'avérer important dans des contextes de développement ou de régulation du cycle cellulaire ou de réponse au stress (43).

Une manière plus fine de réguler l'activité des DUBs est la combinaison de plusieurs autres modifications post-traductionnelles, qui vont moduler l'interaction protéine-protéine et la reconnaissance du substrat ou l'activité catalytique elle-même. Par exemple, la phosphorylation de CYLD suite à une stimulation par TNF- α est requise pour l'accumulation de TRAF2 polyubiquitiné K63, un substrat de CYLD (42).

1.2.4 Fonctions biologiques des DUBs

A part le statut de certaines déubiquitinases comme régulateurs généraux du métabolisme de l'ubiquitine, ou encore dans la deubiquitination des substrats avant la dégradation protéasomale, plusieurs d'entre ces enzymes sont compartimentalisées et hautement spécifiques. En effet, les DUBs jouent des rôles prépondérants dans la croissance et la prolifération cellulaire ainsi que dans le maintien de l'intégrité des cellules en réponse au stress et ce, en participant à des processus fondamentaux de signalisation cellulaire (Tableau 1).

Tableau I. Exemple de déubiquitinases listées avec leurs substrats ainsi que les processus cellulaires dans lesquels elles sont impliquées. Tiré de (43).

Cellular process	DUB (yeast/human)	Substrate or interacting partners	Notes
Ubiquitin processing	Ubp14/Usp5	Polyubiquitin	Processes ubiquitin chains to regenerate free ubiquitin
	Rpn11/POH1	Polyubiquitin	Associates with proteasome to process ubiquitin chains from proximal end before substrate degradation
	Uch37	Polyubiquitin	Associates with proteasome to process ubiquitin chains before substrate degradation
	Ubp6/Usp14	Polyubiquitin	Regulates chain length of proteasome substrates
Histone deubiquitination	Ubp8/Usp22	Histone H2A and H2B	Component of SAGA complex regulating transcription and mRNA export
	Ubp10	Histone H2A	Functions in silencing through its association with the Sir4 protein
	Usp16 (Ubp-M)	Histone H2A	Chromatin remodeling
	Usp21	Histone H2A	Chromatin remodeling
	2A-DUB	Histone H2A	Chromatin remodeling
Cell cycle regulation and DNA repair	Usp28	FBW7	Involved in cell cycle regulation and DNA damage repair pathway
	Usp44	Anaphase-promoting complex	Negatively regulates activation of the anaphase-promoting complex
	Usp1	FANCD2	Regulates DNA repair, defective in Fanconi anemia
	Usp11	BRCA2 (indirect)	DNA damage repair functions
	Usp3	Histone H2A and H2B	Chromatin remodeling
Kinase signaling	A20	RIP1, NEMO	Downregulation of NF- κ B pathway by DUB and ligase activities
	CYLD	TRAF2/6, RIP1, NEMO	Downregulation of NF- κ B pathway by DUB activity
	Usp15	I κ B	Downregulates NF- κ B pathway by stabilizing I κ B
	Usp9Y	MARK4, NUAK1	Regulates AMPK-related kinases
Endocytosis	Ubp4(Doa4)/Usp8	Polyubiquitin	Recycles Ub at the late endosome
	AMSH	EGFR (indirect)	Accelerates EGFR downregulation
	Fat facets (<i>Drosophila</i>), Usp9X	Liquid facets	Adaptor molecules involved in the initial steps of endocytosis

Les évidences par ailleurs se succèdent pour montrer l'implication des DUBs dans le cancer. Des données relativement récentes suggèrent fortement que certaines DUBS sont des suppresseurs de tumeur ou bien des oncogènes. La DUB CYLD, un inhibiteur de la voie de signalisation de NF- κ B, est clairement un suppresseur de tumeurs (44). Concernant les DUBs ayant des propriétés d'oncogènes, l'exemple d'USP7 et USP2a est

à propos pertinent, car ces deux molécules stabilisent l'ubiquitine ligase MDM2 qui dégrade p53, un suppresseur de tumeur largement étudié à ce jour. Cependant USP7 semble aussi participer à la stabilisation de p53 en reversant sa polyubiquitination au niveau des lysines 48 (45, 46, 47).

En tant qu'une déubiquitinase ayant une propriété oncogénique, Dub3 stabilise CDC25A et prévient sa dégradation par le protéasome 26S. La stabilisation de CDC25A observée dans plusieurs types de cancers traduit l'action critique de Dub3 dans la promotion de l'activité oncogénique (48).

Bien que certaines données suggèrent que USP28 joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire en stabilisant des facteurs impliqués dans les points de contrôle et les voies de suppression de tumeurs, d'autres études semblent suggérer que USP28 peut avoir des effets oncogéniques (49). En effet, dans les cellules provenant de certaines tumeurs comme celles du colon et du sein, la surexpression de USP28 semble stabiliser c-Myc en contrecarrant l'activité de Fbw7 et ce, en formant un triplex avec ces deux protéines, particulièrement via l'interaction avec Fbw7 (49).

Pour la protéine BAP1 (BRCA1 Associated Protein1), les évidences montrant son implication dans la régulation de la prolifération, du cycle cellulaire et du développement tumoral, ne laissent pas de doutes quant au caractère suppresseur de tumeur de cette protéine qui, pendant les dix dernières années, a présenté un intérêt particulier pour plusieurs équipes de recherche dont fait partie notre laboratoire. Le chapitre suivant entreprendra de présenter en détails la protéine BAP1 à travers une revue de la bibliographie la concernant.

1.3 BRCA1 Associated Protein 1 : BAP1

BAP1 est un membre de la famille des UCHs, dont fait partie UCH-L1, UCH-L3 et UCH-L5 (Uch37). Comme il a été décrit plus haut, toutes ces protéines possèdent un domaine catalytique conservé, contenant une triade catalytique composée d'une cystéine, d'une histidine et d'un acide aspartique (50). Cependant, BAP1 se distingue par un long domaine C-terminal, absent chez les autres membres des UCHs. Ce domaine s'affiche comme un élément crucial dans la modulation de l'activité de BAP1. Il

permettrait des associations sélectives avec d'autres protéines ainsi que des modifications post-traductionnelles qui affinent sa régulation. Aussi, on y retrouve un signal de localisation nucléaire, ce qui en fait une protéine nucléaire. (Figure 7).

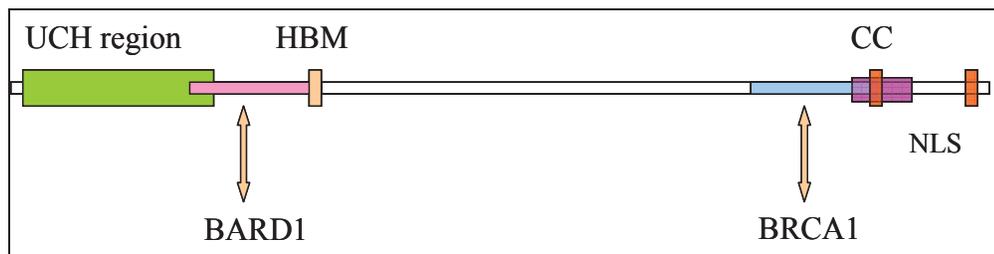


Figure 7. Schéma représentant la séquence de BAP1 avec les différentes régions qui la constituent. De gauche à droite. UCH region: domaine catalytique UCH. En rose: région d'interaction avec BARD1. HBM: Motif de liaison avec HCF. En bleu: région d'interaction avec BRCA1. CC: région coiled coil. NLS: signal de location nucléaire.

1.3.1 BAP1 est un suppresseur de tumeur

BAP1 a été isolée pour la première fois comme étant une déubiquitineuse nucléaire qui interagit avec le suppresseur de tumeur BRCA1. La même étude montre que cette interaction augmente la suppression de la croissance cellulaire médiée par BRCA1 (51). BAP1 agit aussi d'une manière indépendante de BRCA1. En effet, sa surexpression dans des cellules déficientes en BRCA1 inhibe la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (26). Aussi intrigant que ça puisse être, des études récentes suggèrent que la déplétion de BAP1 par ARN interférence affecte négativement la prolifération cellulaire (52, 53, 54). Bref, les résultats, obtenus à ce jour suggèrent que BAP1 est un suppresseur de tumeur. A cet égard, trois évidences viennent appuyer sérieusement cette déclaration: i) Des expériences de xénogreffes (Figure 8) montrent que BAP1 inhibe considérablement la croissance tumorale et ce, grâce à son activité déubiquitineuse (26). ii) BAP1 est muté d'une manière homozygote dans certaines tumeurs du poumon et du sein (51, 55). iii) BAP1 a un potentiel anti-métastatique. En effet, au moment même où je rédige ce mémoire, une étude a été publiée sur un rôle de BAP1 dans l'inhibition transcriptionnelle des voies qui activent la métastase des mélanomes "Uveal". En plus du fait que BAP1 a été trouvée mutée dans 84% de tumeurs métastatiques analysées, la déplétion de BAP1 par siRNA dans des cellules tumorales du mélanome "Uveal" de classe I semble changer la signature transcriptionnelle de ces cellules vers celle des

cellules de classe II, à potentiel métastatique. D'après les conclusions de cette étude, la perte de BAP1 serait donc impliquée dans la métastase des mélanomes "Uveal" (56).

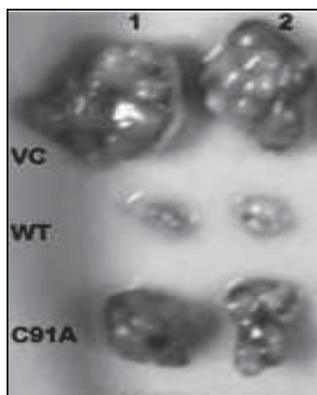


Figure 8. Effet anti tumoral de BAP1. Tumeurs issues de xénogreffes exprimant un vecteur contrôle VC, la forme sauvage de BAP1 WT ou la forme inactive de BAP1 C91S. Adaptée de (26).

1.3.2 BAP1 appartient à des complexes multiprotéiques à vocation transcriptionnelle

Plusieurs études qui ont porté sur BAP1 ont adopté une approche plutôt biochimique. Dans ce sens, des expériences de copurification ont identifié plusieurs protéines associées à BAP1. Pour la protéine HCF et YY1, un lien fonctionnel avec BAP1 a aussi été élucidé et ce, dans une étude récente publiée par notre laboratoire (57).

La protéine HCF-1 (pour "herpes simplex virus (HSV) Host Cell Factor 1") a été initialement décrite pour son rôle dans l'induction des gènes précoces de l'herpès virus par son association avec la protéine VP16 (58). HCF-1 est une protéine abondante, associée à la chromatine, et qui joue un rôle critique dans la prolifération cellulaire (59, 60). Son association avec la chromatine est médiée par un domaine compris dans son extrémité N-terminale, nommé domaine « Kelch », qui interagit avec un motif constitué de quatre résidus, D/EHXY (X pour n'importe quel résidu), appelé motif HBM (pour HCF-1 Binding Motif) et présent dans différentes protéines regroupées dans deux classes principales : des protéines virales telles que VP16 et des protéines cellulaires comme des facteurs de liaison à l'ADN tels que E2F et des cofacteurs transcriptionnels (61). Or, des études récentes montrent que HCF interagit avec BAP1 au niveau de ce motif HBM, et que cette interaction régule la prolifération cellulaire (52, 53).

Le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) est une protéine à doigt de zinc qui possède une double fonction dans la régulation transcriptionnelle. En effet, ce facteur de transcription peut activer ou réprimer l'expression génique, dépendamment de son interaction sélective avec des coactivateurs ou corépresseurs transcriptionnels, sur les promoteurs de gènes spécifiques (62, 63).

Yu et ses collègues ont montré que BAP1 agit au niveau de complexes multiprotéiques de haut poids moléculaire (57). Ces complexes sont majoritairement constitués par des facteurs et des cofacteurs de transcription. Sur le plan mécanistique, ils montrent que BAP1 interagit directement avec YY1 et que HCF est requise pour cette interaction *in vivo*. De plus, YY1 recrute BAP1 et HCF sur le promoteur de gène spécifique comme *cox7c* pour activer son expression.

D'autres protéines associées à BAP1 ont été confirmées par cette étude et identifiées par d'autres. Nous pouvons citer des protéines associées aux processus chromatinien comme les facteurs de transcription FOXK1 et FOXK2, l'Histone Acétyltransférase HAT1, ASXL1 et ASXL2 comme homologues humains de Additional sex combs ASX, l'Histone Lysine Déméthylase LSD2 (KDM1B) et l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 UBE2O.

Très récemment, la protéine polycomb Calypso de la drosophile a été identifiée comme l'orthologue de BAP1. Calypso s'associe à ASX pour former le complexe PR-DUB qui débiquitine l'histone H2A et régule l'expression des gènes *hox* (64). Néanmoins, le nombre et la nature des protéines associées à BAP1 chez les humains ajouterait une complexité dans la régulation et la fonction de cette dernière.

1.3.3 Un rôle probable de BAP1 dans la réponse aux dommages à l'ADN

Nous avons évoqué dans le chapitre précédent des fonctions démontrées de BAP1 dans la régulation de la transcription et de la prolifération cellulaire. Cependant, plusieurs indications pertinentes suggèrent que BAP1 pourrait être un acteur important dans la réponse aux stress génotoxiques. Nous essaierons dans ce chapitre de passer en revue les connaissances globales acquises jusqu'à ce jour concernant les voies qui gouvernent la réponse des cellules aux différents types de stress génotoxique. Nous présenterons alors les bases qui nous ont poussés à formuler notre hypothèse et à réaliser cette étude,

très prometteuse pour avancer dans notre connaissance des bases moléculaires qui permettent à la cellule de protéger son génome et de prévenir le développement tumoral.

1.3.3.1 Les types de dommages et leurs origines

1.3.3.1.1 Les dommages d'origine endogène

- Altérations spontanées de bases:

La vie cellulaire se déroulant en milieu aqueux et aérobie, l'ADN est en permanence confronté à des réactions chimiques spontanées avec l'eau et les molécules oxygénées du milieu. Il survient donc en permanence des réactions d'hydrolyses entre les bases de l'ADN et l'eau (par exemple la déamination des cytosines en uraciles) mais également des réactions d'oxydation entre l'ADN et les espèces oxygénées réactives (ROS) produites par le métabolisme (par exemple la formation de 8-oxoGuanine). Ces bases chimiquement modifiées ne sont plus correctement reconnues par les machineries de réplication et transcription.

- Défauts de réplication

De manière générale, la réplication de l'ADN est un mécanisme relativement fidèle même si cette fidélité est influencée par de très nombreux facteurs. Cependant, des erreurs peuvent se glisser lors du processus. Il peut y avoir incorporation d'une base qui n'est pas complémentaire de la matrice. Cette erreur est appelée mésappariement (mismatch). Il peut aussi arriver qu'un précurseur de base endommagé soit incorporé dans l'ADN. En effet, les précurseurs de base sont exposés aux ROS autant que l'ADN et il arrive que du 8-oxo-dGTP soit incorporé à la place du dGTP. D'autre part, il peut arriver que la progression de la fourche de réplication soit perturbée par la rencontre avec une lésion. La présence de cette lésion empêche la progression de la polymérase pendant que l'hélicase continue de dérouler l'ADN. Cela génère rapidement une région d'ADN simple-brin qui est détectée et prise en charge par la cellule comme un dommage à l'ADN. Les fourches bloquées peuvent aussi régresser, et par l'action d'enzymes, donner des cassures double-brin. Ce phénomène est appelé « stress réplicatif ».

Tableau II. Exemples de stress génotoxiques naturels ou artificiels et dommages occasionnés sur l'ADN

		Source génotoxique	Types de dommages
Origine endogène	Métabolisme oxydatif		Altérations chimiques de bases
	Défauts de réplication		Mésappariements, fourches de réplication bloquées, cassures
Origine environnementale	Physique	Radiations ionisantes (X, α , β , γ)	Cassures simple et double-brin
		UV	Photoproduits et pontages, cassures
	Chimique	Agents alkylants (cisplatine, melphalan, MMS...)	Pontages intra- et inter-brins, pontages ADN-protéines
		Drogues clivantes (bléomycine, calichéamicine...)	Cassures simple et double-brin
		Inhibiteurs de topoisomérases (camptothécine, étoposide, doxorubicine...)	Cassures (phase S-dépendantes)

1.3.3.1.2 Les dommages d'origine environnementale

- Radiations ionisantes:

Il existe des sources naturelles de rayonnements ionisants de type X, α , β ou γ comme les radiations cosmiques et la radioactivité naturelle des sols et des roches. Tous les organismes y sont bien sûr exposés. On peut citer également pour les humains les traitements médicaux à base de rayonnements (radiothérapie).

Les radiations ionisantes ont des effets directs et indirects sur la molécule d'ADN. Les effets directs résultent de l'ionisation des bases et des sucres par l'énergie des radiations. Les effets indirects sont dus à l'attaque de l'ADN par des espèces réactives formées dans le milieu sur le passage du rayonnement (radicaux ioniques ou libres). Cela correspond principalement à l'ionisation des molécules d'eau, qui sont prépondérantes. On retrouve ainsi les ROS mais en quantité bien plus importante que celle produite par le métabolisme basal de la cellule. Les dommages générés par les radiations ionisantes peuvent donc être des altérations de base comme vu précédemment, mais surtout des cassures simple et double-brin de l'ADN, essentiellement provoquées par l'action des radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$ hautement réactifs

sur les sucres. L'effet létal des radiations ionisantes est attribué principalement à ces cassures de l'ADN et en particulier aux cassures double-brin.

- Rayonnements ultraviolets:

Les rayons ultraviolets (UV) sont subdivisés en 3 groupes, définis par la longueur d'onde du rayonnement : les UV-A (320 à 400nm), les UV-B (295 à 320nm) et les UV-C (100 à 295nm). La lumière solaire arrivant sur terre contient essentiellement des UV-A et UV-B, les UV-C étant arrêtés par l'air et la couche d'ozone. Les organismes vivants ne sont donc pas naturellement exposés aux UV-C. Cependant, on les utilise très fréquemment en laboratoire car leurs effets sont spécifiques à l'ADN (la longueur d'onde des UV-C « de laboratoire », 254nm, est proche de l'absorption de l'ADN qui est de 260nm, et n'est pas absorbée par les protéines) et ils induisent les mêmes lésions que les UV-A et UV-B avec une bien meilleure efficacité. Les UV provoquent des dommages de différentes natures dans l'ADN. La catégorie majoritaire de dommages correspond aux photoproduits : l'absorption de photons par le cycle aromatique de la base azotée provoque des liaisons covalentes entre deux bases consécutives, spécifiquement des pyrimidines. Il y a ainsi apparition de dimères de pyrimidines. On distingue essentiellement deux types de dimères : les CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer) et les (6-4) PP (6-4 Photoproducts), selon les carbones qui se sont liés. Notons que les CPD se forment plus fréquemment entre deux T, par contre les (6-4) PP se forment plutôt au niveau des T-C ou C-C. Ce type de dommages entraîne des distorsions de la structure en double hélice. Enfin, d'autres types de dommages peuvent être induits par les UV : d'autres photoproduits, des pontages (cross-links) entre ADN et protéines mais aussi des cassures de brins à très haute dose d'UV.

- Agents chimiques:

Les agents chimiques pouvant endommager l'ADN sont multiples. Nombre d'entre eux sont utilisés en chimiothérapie. On peut citer tout d'abord les agents alkylants comme le cisplatine, le melphalan ou le MMS (Methyl Methanesulfonate). Ces composés possèdent un ou plusieurs groupement(s) électrophile(s) qui vont attaquer les centres nucléophiles dans l'ADN. On trouve des sites « attaquables » dans les 4 bases de l'ADN même si les bases les plus sensibles sont A et G. Ainsi, si l'agent alkylant possède un seul groupement réactif, il formera un monoadduit en se « soudant » via ce groupement à une base de l'ADN. Par contre s'il en possède plusieurs (comme le cisplatine), il pourra générer des pontages en réagissant par chacun de ses groupements avec des brins complémentaires (pontage interbrin), ou deux bases d'un même brin (pontage intrabrin),

ou encore une base et une protéine (pontage ADN-protéine). Ces pontages créent également de fortes distorsions dans la structure de l'ADN. Il existe également de nombreuses drogues qui provoquent des cassures : la bléomycine et la calichéamicine par exemple qui clivent le brin d'ADN au niveau du désoxyribose. Dans le cas de la calichéamicine, il y a génération quasi-exclusive de cassures double-brin par rapport aux cassures simple-brin (65). Dans les autres cas, ce sont principalement des cassures simple-brin. Cependant, lorsque les sites de clivage se font face sur les brins opposés, on obtient des cassures double-brin. Certaines drogues provoquent également des cassures par un mécanisme indirect : c'est le cas des inhibiteurs de topoisomérases, des enzymes qui manipulent la topologie de l'ADN en coupant et refermant l'ADN double-brin. On peut citer la camptothécine (inhibiteur de la topoisomérase I) ou l'étoposide et la doxorubicine (inhibiteurs de la topoisomérase II). Ces molécules bloquent l'action de la topoisomérase pendant la réaction et l'enzyme reste figée dans un état intermédiaire, liée aux extrémités d'ADN clivées. Lors de la phase S, la collision d'une fourche de réplication avec ces complexes provoque des cassures. L'effet de ces drogues est donc observé lorsque la cellule a effectué au minimum une phase de réplication.

1.3.3.2 Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN

Les lésions de l'ADN évoquées précédemment (rupture de la molécule et/ou altération de bases) sont délétères pour la cellule dans la mesure où elles mettent en péril les mécanismes qui nécessitent une reconnaissance de la séquence primaire : transcription et réplication, ainsi que l'intégrité du patrimoine génétique. La cellule dispose d'un ensemble de solutions plus ou moins radicales pour gérer ces dommages : activer des points de contrôle qui arrêtent le cycle cellulaire, effectuer la réparation des dommages, et même déclencher l'apoptose en cas de dommages irréversibles (Figure 9).

1.3.3.2.1 Détection des dommages et activation des points de contrôle

- Les protéines senseurs de dommages:

Afin de prendre en charge d'éventuels dommages dans son ADN, une cellule doit d'abord être capable de les détecter. Cela est possible grâce à l'intervention de protéines « senseurs » qui reconnaissent plus ou moins spécifiquement un type de lésion. Par exemple le complexe MRN se lie directement aux cassures double-brin (66). Il est composé de Mre11 (exonucléase/endonucléase), Rad50 (ATPase/adenylate kinase) et

Nbs1. Ce sont des complexes multiprotéiques structurés en anneaux, respectivement très proches des complexes PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et RFC impliqués dans la réplication (67). Le complexe RFC-like que l'on appelle « clamp loader » charge le complexe 9-1-1 (« clamp ») sur des régions simple-brin de l'ADN grâce à la protéine RPA (Replication Protein A) (68). Ces deux complexes participent donc à la signalisation de nombreux dommages puisqu'ils dépendent seulement de la présence d'ADN simple-brin, structure souvent générée lors de dommages à l'ADN et au niveau des fourches de réplication bloquées (70).

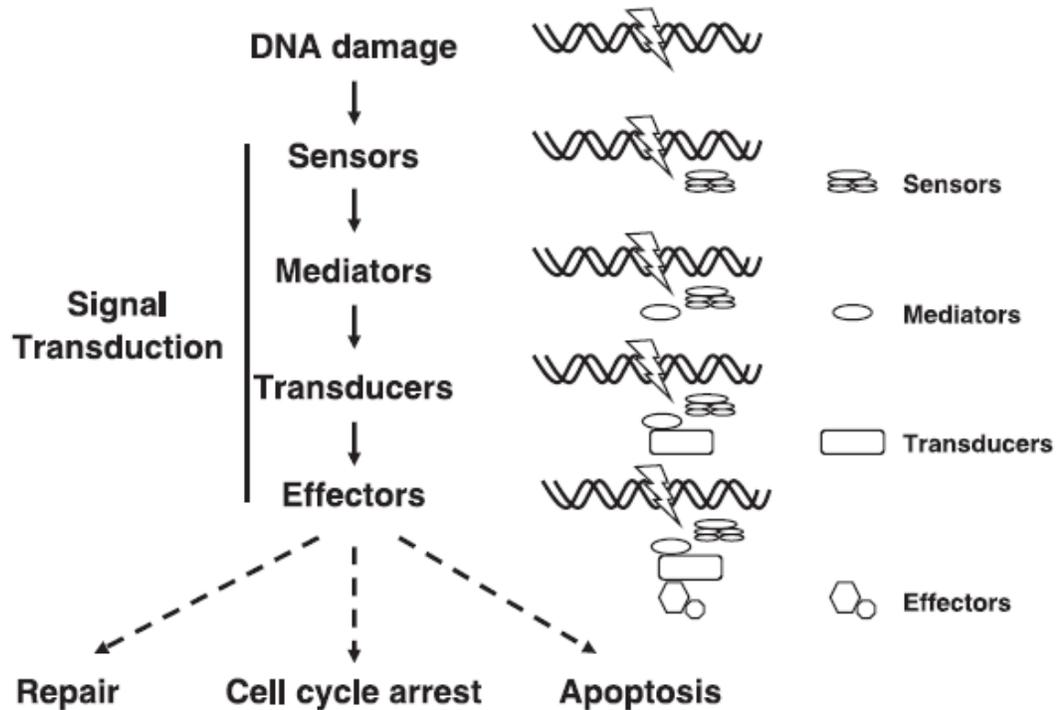


Figure 9. Organisation conceptuelle de la transduction de signal lors de la réponse aux dommages à l'ADN. Le dommage est reconnu par les senseurs. Le signal est ensuite transmis aux transducteurs, principalement des kinases. Ces transducteurs vont inactiver les kinases effectrices comme les CDKs pour arrêter les cellules à une phase spécifique du cycle cellulaire. Une signalisation se fait lors de cet arrêt pour réparer les lésions qui, à défaut, amèneront la cellule à amorcer la mort cellulaire programmée: l'apoptose (69).

- Les kinases ATM et ATR:

Rapidement, ces senseurs recrutent des kinases essentielles dans la réponse aux dommages à l'ADN : les kinases ATM et ATR. Ce sont de grosses protéines de la famille PIKK (71, 72). Elles possèdent une activité sérine/thréonine kinase et ont de nombreuses cibles cellulaires dont certaines sont communes. ATM est exclusivement activée par les cassures double-brin car elle est recrutée spécifiquement par le complexe

MRN, alors que ATR est plus polyvalente : en effet, elle est recrutée via son partenaire ATRIP sur l'ADN simple-brin recouvert de RPA (70), et de nombreux dommages génèrent de l'ADN simple-brin (radiations ionisantes, UV, fourches de réplication bloquées...). Le recrutement d'ATR ne dépend pas des complexes 9-1-1 et RFC-like mais il est proposé que leur présence participe à l'activité d'ATR sur ses cibles. ATM est présente dans la cellule sous forme d'un dimère inactif. En réponse à des cassures double-brin, elle est activée et recrutée sur les lésions (71, 72). Ce processus fait intervenir le complexe MRN, senseur des cassures double-brin. Cependant, le mécanisme d'activation d'ATM par MRN reste controversé. Il est admis que MRN interagit avec ATM via sa sous-unité Nbs1 et permet sa monomérisation et son activation mais il n'est pas encore tout à fait déterminé si l'activation se produit avant ou après le recrutement d'ATM à la cassure via MRN. En tous cas, l'activation d'ATM se traduit par une autophosphorylation sur la sérine 1981 et le dimère se dissocie. ATM peut alors se lier de façon stable à ses protéines cibles et les phosphoryler. Il n'a pas été mis en évidence d'autophosphorylation d'ATR *in vivo*. D'ailleurs, ATR n'existe pas sous forme d'homodimère dans la cellule, mais sous forme de complexe avec ATRIP.

- Les protéines médiatrices:

Une des cibles d'ATM est l'histone H2AX, qu'elle phosphoryle sur la sérine 139 (73). La présence de γ H2AX est à la fois un marquage de la zone lésée et un médiateur de l'amplification du signal. En effet, la phosphorylation de H2AX s'étend sur plusieurs mégabases autour de la lésion (74) et permet le recrutement d'autres médiateurs. Parmi ces médiateurs, un groupe de protéines contenant un domaine BRCT (BRAC1 C-terminus Repeat) qui permet l'interaction avec des protéines phosphorylées : on peut citer MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1), 53BP1 (p53 Binding Protein 1) et BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility Gene 1). Toutes ces protéines sont phosphorylées par ATM et colocalisent au niveau des foyers de γ H2AX induits par les cassures double-brin (75, 76). Elles stimulent l'activité d'ATM sur ses nombreuses cibles et permettent également d'amplifier son activation. ATR phosphoryle également H2AX (77), mais les médiateurs sont différents. Il semble que la présence de Rad17 et Hus1 (complexes 9-1-1 et RFC-like) soient nécessaires à l'activation de la cible Chk1 par ATR, ainsi qu'une protéine appelée Claspin.

Tableau III. Classification des gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire selon leur fonction. Tiré de (69).

Function	Class	Gene
Sensor	RFC1-like	<i>RAD17</i>
		<i>RFC2-5</i>
	PCNA-like	<i>RAD9</i>
		<i>RAD1</i>
Mediator	BRCT-containing	<i>Hus1</i>
		<i>BRCA1</i>
		<i>53BP1</i>
		<i>TopBP1</i>
	MRN complex	<i>MDC1</i>
		<i>Mre11</i>
		<i>RAD50</i>
		<i>NBS1</i>
Transducer kinase	PI3 kinase like protein	<i>ATR-ATRIP</i>
		<i>ATM</i>
		<i>DNA-PK-Ku</i>
	Checkpoint kinases	<i>Chk1</i>
		<i>Chk2</i>
Effector	Transcription factor	<i>p53</i>
	Phosphatases	<i>Cdc25A, B, C</i>
	Kinases	<i>Cyclin-Cdks</i>
		<i>CDC7</i>

- Arrêt à la transition G1/S:

Une fois activées, ATM et ATR vont phosphoryler et activer de nombreuses cibles (69). ATM phosphoryle la kinase Chk2 sur la thréonine 68 (78, 79) et l'ubiquitine ligase Mdm2 sur la sérine 395 (80). Ces événements ont pour résultat de stabiliser la protéine p53. En effet, Chk2 activée phosphoryle à son tour p53 sur la sérine 20 (81) et entraîne sa dissociation de Mdm2. La phosphorylation de Mdm2 empêche quant à elle l'export nucléaire de p53 nécessaire à sa dégradation. Ces deux modifications inhibent donc l'ubiquitination de p53 par Mdm2 et sa dégradation par le protéasome, ce qui permet sa stabilisation. Ainsi les niveaux de p53 augmentent et deviennent suffisants pour activer la transcription de ses gènes cibles. A noter que ATM peut également phosphoryler directement p53 sur la sérine 15, ce qui stimule son activité transactivatrice (82). Un des gènes cibles majeurs de p53 est le gène *p21*. La protéine p21 va inhiber l'activité du

complexe Cdk2/Cycline E impliqué dans la transition G1/S et ainsi arrêter la progression des cellules dans le cycle en G1. C'est l'un des points de contrôle majeurs en réponse aux dommages. Ce délai est nécessaire à la réparation complète des dommages. ATR provoque également l'arrêt en G1 par le même mécanisme, en phosphorylant directement p53 sur la sérine 15 et en activant Chk1 qui phosphoryle p53 sur la sérine 20.

Enfin, il existe un point de contrôle en réponse aux dommages à l'ADN au début du processus de réplication. Dans ce cas-là, la signalisation repose sur la dégradation de la phosphatase Cdc25A. En effet, les kinases Chk2 et Chk1, phosphorylées respectivement par ATM et ATR, sont capables de phosphoryler Cdc25A sur la sérine 123, ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (83). Ainsi, le complexe Cdk2/CyclineA, requis pour le déclenchement des origines de réplication n'est plus activé.

- Arrêt à la transition G2/M:

L'activation de Chk2 joue également un rôle dans la mise en place du point de contrôle en G2. En effet, Chk2 activée peut phosphoryler à son tour la phosphatase Cdc25C sur la sérine 216 et entraîner son export nucléaire et sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (84). Ainsi, Cdc25C ne peut plus activer le complexe Cdk1/CyclineB impliqué dans l'entrée en mitose. Le cycle cellulaire est donc bloqué en G2. ATR peut également participer à ce blocage en phosphorylant la kinase Chk1 sur la sérine 345 (85). Cette dernière est capable comme Chk2 de phosphoryler Cdc25C.

Remarque : je n'ai cité ici que quelques modifications post-traductionnelles impliquées dans les arrêts du cycle cellulaire en G1 et en G2 en aval des kinases ATM et ATR. Néanmoins, il existe de nombreuses autres modifications formant tout un réseau destiné à inhiber les activités de complexes Cdk/Cycline (Figure 10) en différents points du cycle (69).

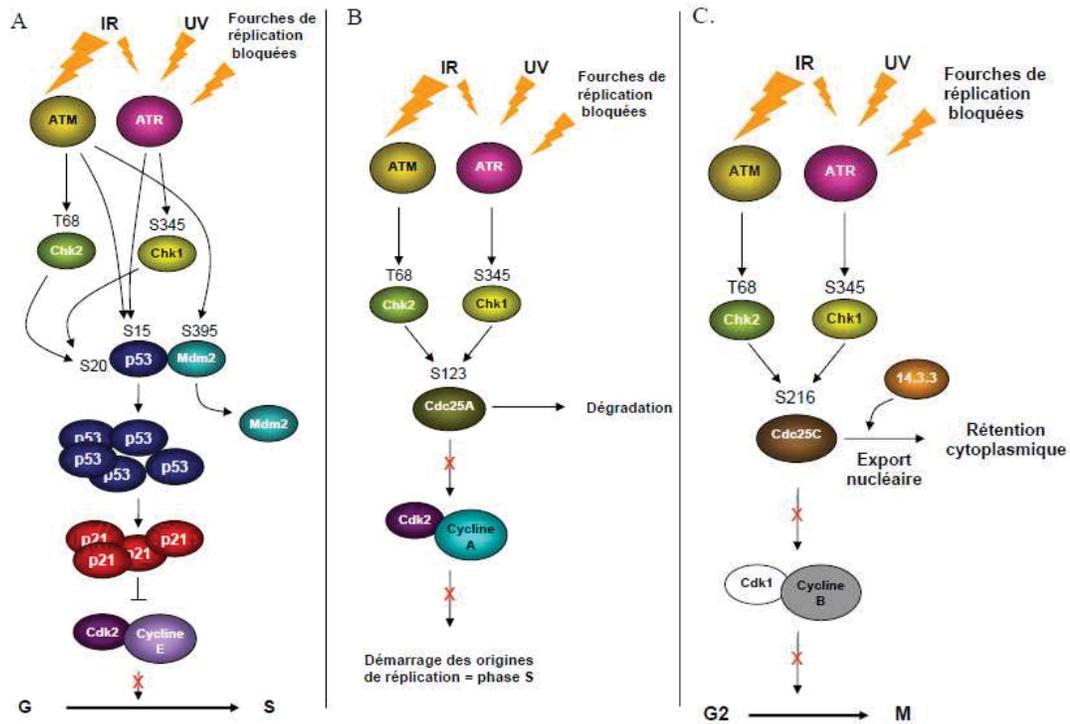


Figure 10. Vue globale des points de contrôle du cycle cellulaire induits par les dommages à l'ADN. La réponse aux dommages commence par la détection de la lésion par des senseurs. Ces senseurs permettent de recruter rapidement les kinases ATM ou ATR qui sont responsables de la phosphorylation de H2AX et donc de la formation de foci, consécutifs au recrutement de nombreux médiateurs. L'amplification de signal qui en résulte permet l'activation des transducteurs, principalement des kinases qui, à leur tour, activent ou inhibent les effecteurs de la réponse cellulaire. Leur action, en interaction avec les voies transcriptionnelles, définit la nature de cette réponse : arrêt du cycle, réparation et/ou apoptose. A. Point de contrôle en G1/S. B. Point de contrôle en début de S. C. Point de contrôle en G2/M.

L'action des complexes CDK-Cyclines est critique car elle régule l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription comme les complexes RBs-E2Fs (Figure 11) ou la protéine FOXM1 (Figure 12) qui vont soit réprimer, soit activer l'expression des gènes impliqués, dans l'activation du point de contrôle ou sa maintenance.

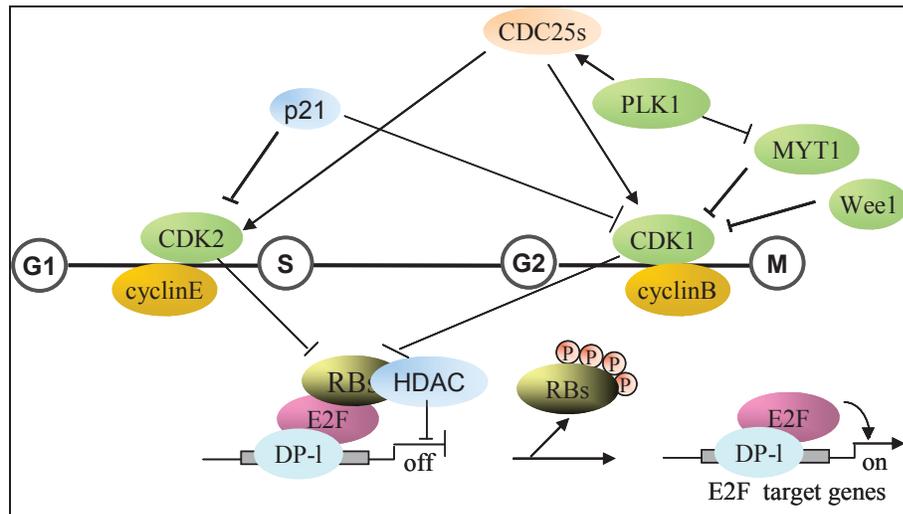


Figure 11. Rôle des complexes CDKs-Cyclines dans la régulation des complexes RBs-E2Fs et l'impact sur l'expression des gènes impliqués dans les transitions du cycle cellulaire

Cela pourrait traduire comment les cellules entament un arrêt du cycle cellulaire et comment ils en sortent. Cette régulation est vitale pour la cellule car elle permet à la cellule, suite aux stress génotoxique, de réparer les lésions au niveau de son ADN avant de se répliquer ou avant de se diviser. Ainsi elle maintient son intégrité génomique et se protège contre la carcinogénèse.

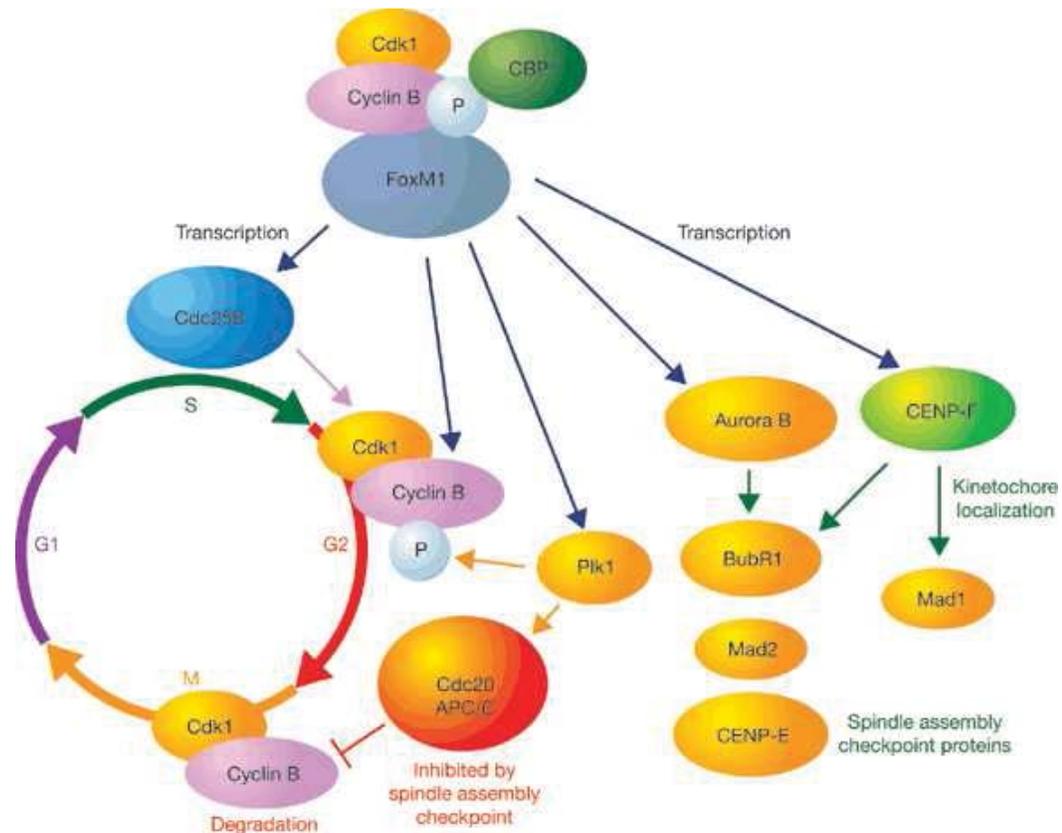


Figure 12. Rôle de FoxM1 dans la régulation transcriptionnelle de la progression G2/M du cycle cellulaire. Les gènes cibles de FoxM1 qui régulent la transition G2/M sont représentés. On trouve les gènes codant pour Plk1, CENP-F, la phosphatase CDC25B, la kinase Aurora B et la Cycline B. Tirée de (86).

1.3.3.2.2 La réparation d'ADN:

Il existe de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN, spécifiques de chaque type de lésion:

- *La réparation par excision de base* (ou BER pour Base excision repair en anglais)

La "BER" un mécanisme de réparation d'un dommage au niveau d'une base individuelle de l'ADN. Un tel dommage est réparé par simple élimination de la base, suivi du clivage du désoxyribose, puis d'une nouvelle synthèse.

- *La réparation par excision de nucléotides ou NER* (pour Nucleotide excision repair) est un des systèmes naturels permettant - dans une certaine mesure - la réparation de l'ADN endommagé (par exemple par une exposition aux UV ou à la radioactivité).

Il permet de corriger principalement les lésions étendues ou qui déforment de manière importante l'ADN, comme par exemple les pontages avec des molécules exogènes. Il freine le vieillissement de l'organisme, limite les mutations délétères et le risque d'apparition de tumeurs et cancer.

- *Le " mismatch repair" désigne le système de reconnaissance et de réparation des mésappariements de l'ADN. Ce mécanisme est conservé dans l'évolution, depuis les bactéries, jusqu'à l'homme. Il est essentiel pour maintenir l'intégrité de l'information génétique contenue dans le génome au cours des multiples divisions cellulaires.*

J'ai choisi de détailler dans mon manuscrit les deux mécanismes principaux de réparation des cassures double-brin : la recombinaison homologue (HR) et la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) afin de mieux servir l'orientation de mon projet de recherche.

- Réparation par recombinaison homologue (HR)

La recombinaison homologue est une des voies de réparation des cassures double brins dans les cellules de mammifères (87). Elle utilise des séquences d'ADN homologues, ce qui en fait un processus relativement fidèle (88). La première étape correspond à la reconnaissance de la lésion par le complexe MRN. L'interaction avec l'ADN se fait par la sous-unité Mre11 qui contient deux sites de liaison à l'ADN.

Les sous-unités Rad50 permettent, en interagissant via leurs motifs CXXC, de rapprocher les deux extrémités de la cassure en vue de sa réparation. Après la liaison de MRN, il y a digestion de l'ADN à partir des extrémités dans le sens 5'-3' par une exonucléase, générant ainsi des extrémités simple-brin 3' sortantes de taille importante (Figure 13). Cette étape pourrait être effectuée par la protéine Mre11 elle-même qui possède une activité exonucléase et/ou par d'autres nucléases (88).

Sur la région d'ADN simple-brin ainsi formée viennent ensuite se fixer sous la forme de filaments de nombreuses protéines comme RPA qui reconnaît spécifiquement l'ADN simple-brin, et la protéine Rad51. La fixation de Rad51 est facilitée par l'intervention de protéines telles que BRCA1, BRCA2, les paralogues de Rad51 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2) et Rad52. Puis, une recherche d'homologie dans le génome s'effectue par invasion du brin d'ADN dans la chromatide sœur ou le chromosome homologue (88).

La protéine Rad54 intervient alors dans la formation de la D-loop et la stabilisation de la structure. Enfin, l'ADN Polymérase η se charge de la synthèse d'ADN, puis, après la ligation, la jonction de Holliday est résolue avec ou sans « crossing-over ». La séquence initiale est ainsi restaurée sans erreur (88).

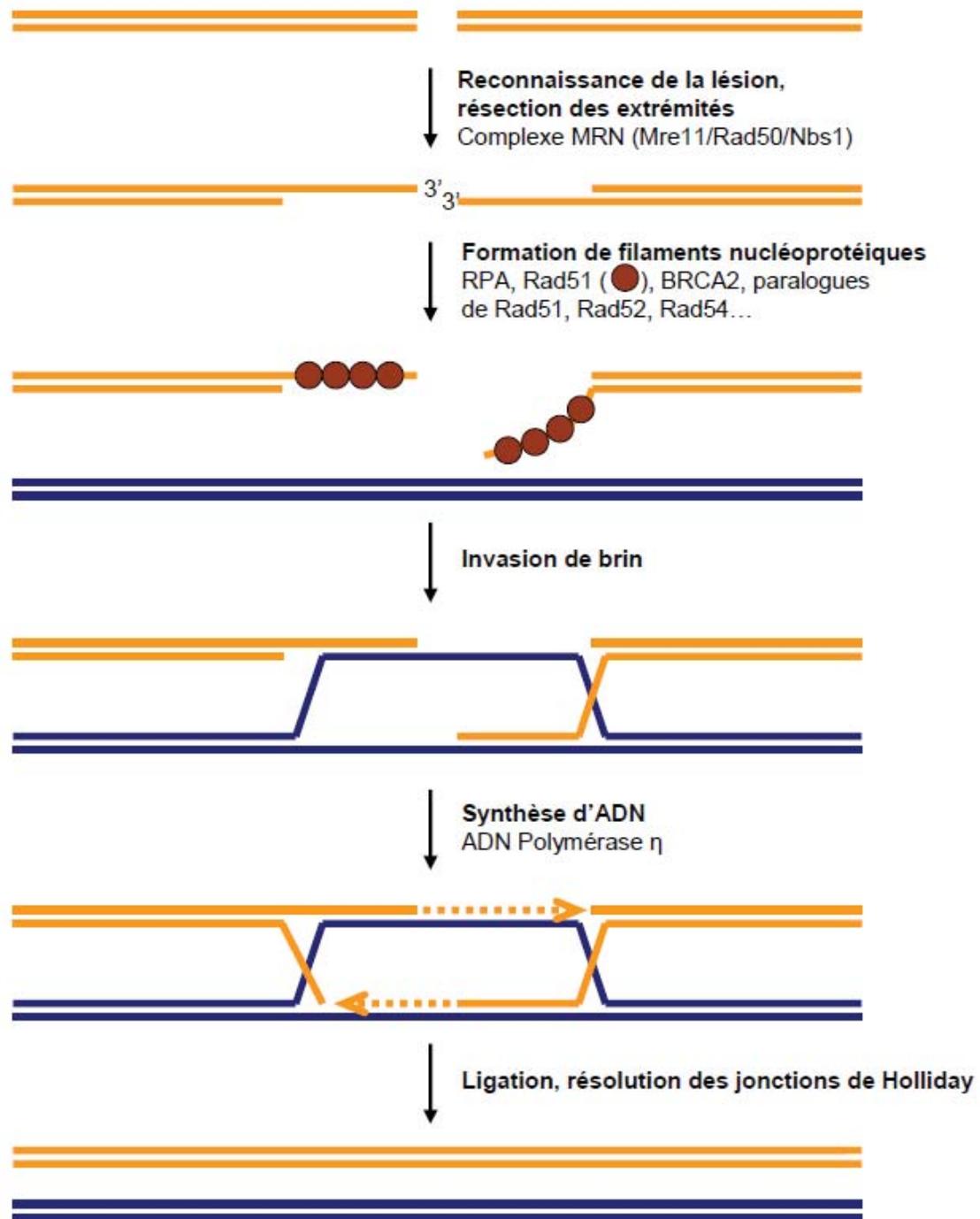


Figure 13. Représentation simplifiée du mécanisme de recombinaison homologue
Après reconnaissance de la lésion par le complexe MRN, les extrémités sont digérées par une exonucléase de manière à générer des grandes régions d'ADN 3' sortantes. Sur ces régions viennent se fixer de nombreuses protéines, notamment Rad51, qui forment des filaments nucléoprotéiques capable de rechercher des zones d'homologie dans le génome. Il y a ensuite invasion de brin dans la chromatide soeur ou le chromosome homologue et synthèse d'ADN par l'ADN Polymérase η . Enfin, il y a ligation et résolution des jonctions de Holliday (ici, représenté sans « crossing-over »). Tirée de (88).

- Réparation par ligation des extrémités non homologues (NHEJ)

Le NHEJ (Non Homologous End Joining) est le principal mécanisme de réparation des cassures double-brin dans les cellules de mammifères. Il consiste en la re-ligation directe des extrémités d'ADN après une courte étape de maturation.

C'est un processus moins fidèle car il peut conduire à des petites délétions de nucléotides (pour revue (89)). Comme pour la recombinaison homologue, c'est le complexe MRN qui reconnaît la cassure. Cependant, dans le cas du NHEJ, la digestion est plus limitée et les extrémités simple-brin générées moins longues. Le processus de NHEJ est ensuite initié par la fixation de l'hétérodimère Ku70/80 aux extrémités libres d'ADN (Figure 14). Ce complexe adopte une structure en anneau autour du de l'ADN. La présence de Ku70/80 permet ensuite le recrutement d'une grosse protéine de la famille des PIKK : DNA-PKcs. L'ensemble forme alors la DNA-PK et l'interaction entre deux DNA-PKcs assure le pontage des extrémités de la cassure. Cette structure particulière porte le nom de complexe synaptique. A ce moment-là, la DNA-PKcs s'autophosphoryle, une étape requise pour le NHEJ.

La formation du complexe synaptique entraîne alors le recrutement des effecteurs du NHEJ. On observe le recrutement successif ou simultané (la cinétique précise n'est pas encore établie) du complexe XRCC4/Ligase IV, de la protéine XLF (XRCC4-like Factor) et de différentes activités enzymatiques chargées de la maturation des extrémités nécessaires à la religation.

Dans le cas d'extrémités protubérantes courtes et parfaitement cohésives, la religation peut s'avérer très simple et ne nécessiter qu'une maturation mineure : l'ajout d'un groupement phosphate en 5' et l'action inverse en 3'. Cette maturation est effectuée par la PNK (Polynucleotide Kinase) qui possède des activités 5' DNA kinase et 3' DNA phosphatase.

Par contre, si l'homologie des régions simple-brin n'est pas parfaite, deux solutions sont envisageables pour obtenir des bouts francs facilement ligables : soit synthétiser de l'ADN en utilisant les régions simple-brin comme matrice (rôle des ADN Polymérase μ et λ), soit cliver les extrémités protubérantes (rôle de l'endonucléase Artémis). Dans ce dernier cas, il y a perte d'information.

Après ces étapes de maturation, la PNK peut agir et les extrémités sont prêtes à être religuées par le complexe XRCC4/Ligase IV.

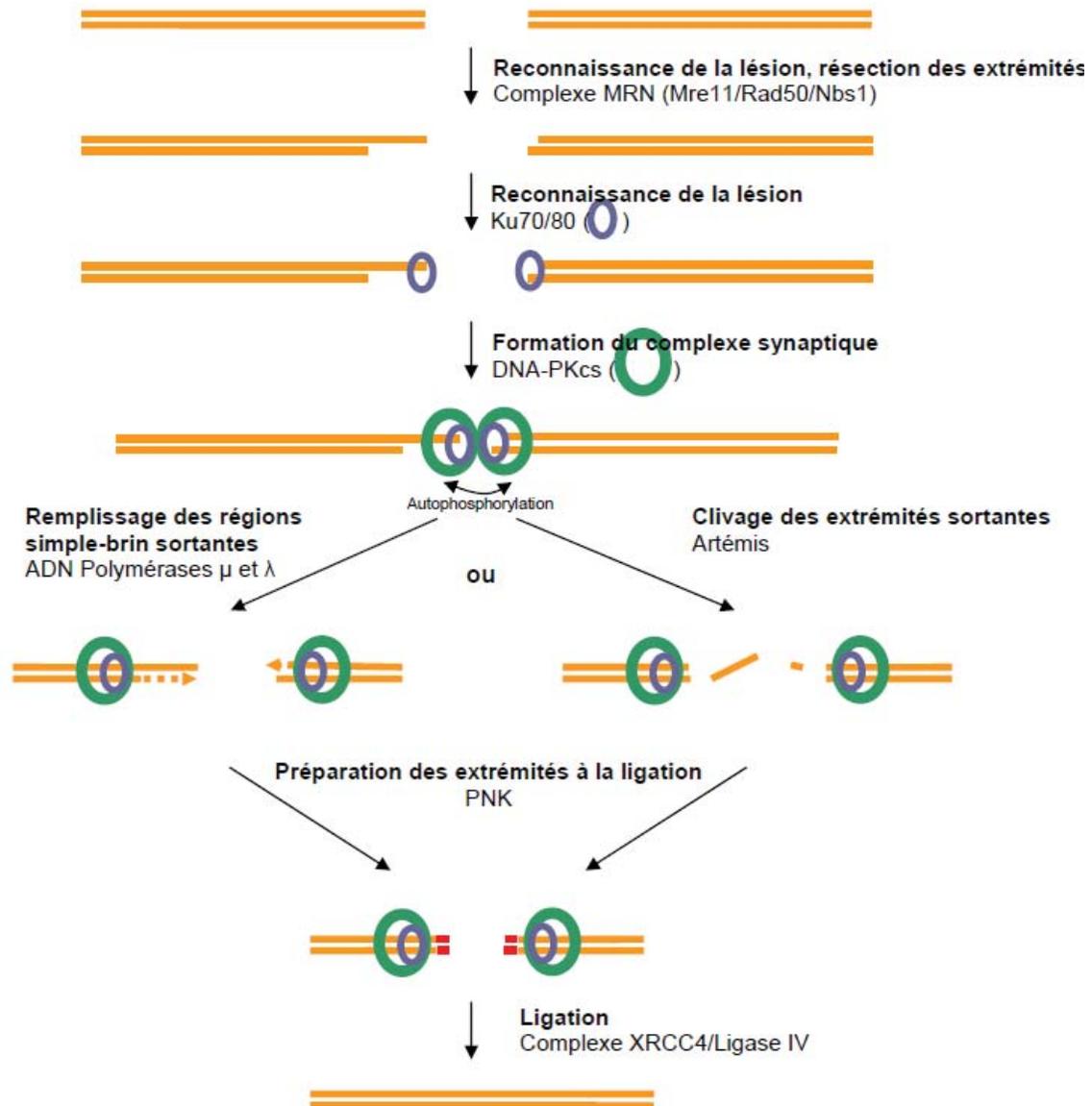


Figure 14. Représentation simplifiée du mécanisme de NHEJ. Tout d'abord, le complexe MRN reconnaît la lésion et Mre11 digère une partie des extrémités pour générer des régions simple-brin de taille limitée. La NHEJ est ensuite initiée par la fixation de Ku70/80 aux extrémités de la cassure, suivie du recrutement de DNA-PKcs qui forme le complexe synaptique en interagissant avec son vis-à-vis. Cela permet son autophosphorylation. Par la suite, soit il y a synthèse d'ADN par les ADN Polymérase μ et λ , soit il y a clivage des fragments protubérants par l'endonucléase Artémis pour retrouver des extrémités franches. Après maturation par la PNK, les extrémités sont liguées par le complexe XRCC4/Ligase IV. Tirée de (89).

1.3.3.2.3 Apoptose

En plus de la sénescence, la réponse la plus radicale en cas de dommages à l'ADN est la mort cellulaire programmée ou apoptose. Elle n'est pas systématique et il est plutôt supposé qu'elle soit mise en œuvre seulement en cas de dommages irréparables, afin

d'éliminer de l'organisme une cellule potentiellement dangereuse. L'apoptose est une forme de mort cellulaire nécessitant la mise en place d'un programme d'expression génique spécifique et l'activation en série de protéases appelées caspases. Elle se traduit tout d'abord par une condensation et une fragmentation de l'ADN. Puis la cellule est désassemblée en vésicules qui sont éliminées par les macrophages. Il est communément admis que deux voies principales dites « intrinsèque » et « extrinsèque » conduisent à l'apoptose (Figure 15).

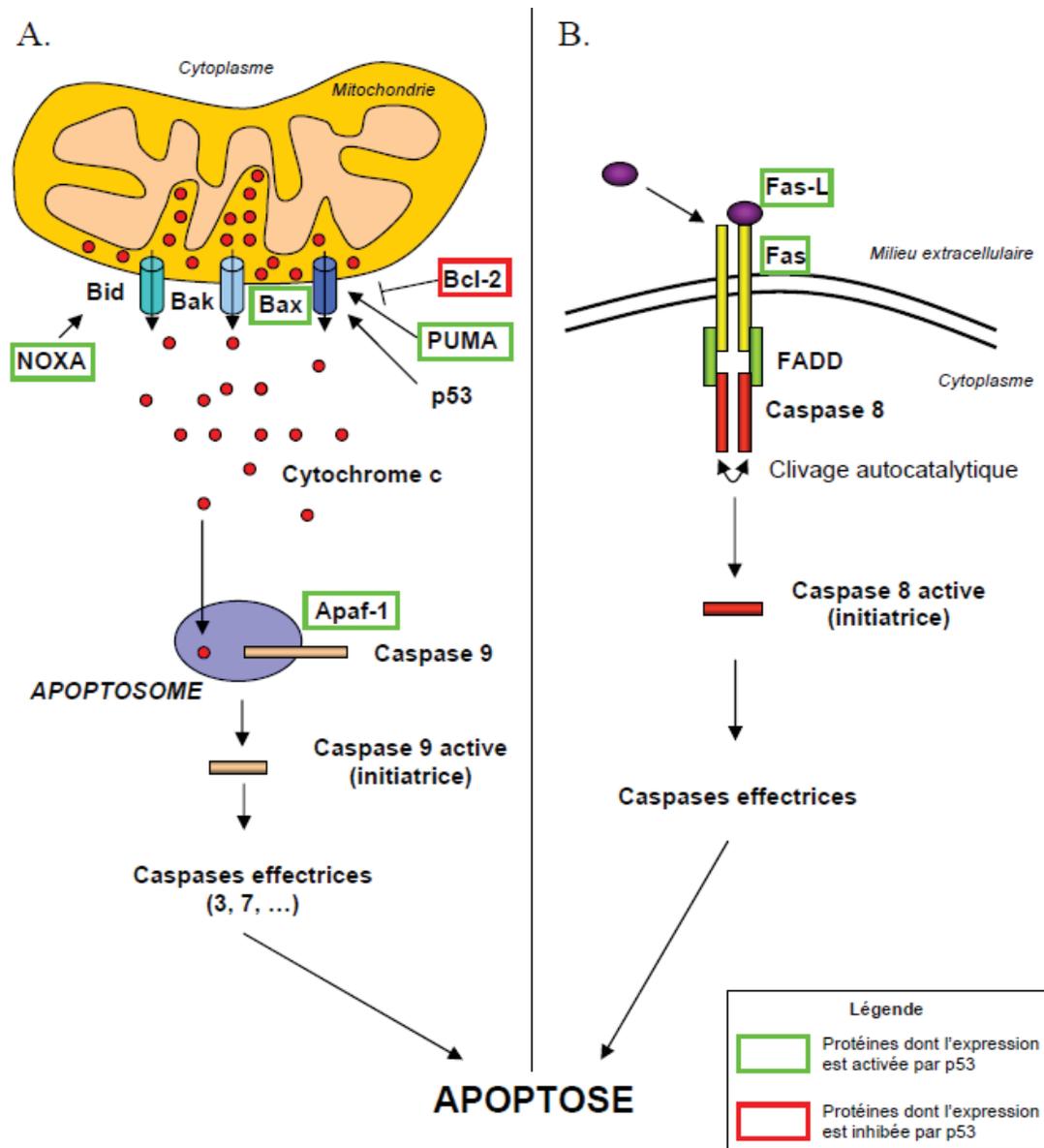


Figure 15. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose et interventions de p53.
 A. Voie intrinsèque ou mitochondriale. Le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme grâce aux protéines pro-apoptotiques de la famille BH3-only (BAX, BAK, BID...). Les protéines PUMA, NOXA et p53 favorisent le processus alors que Bcl-2 l'inhibe. Le cytochrome c forme l'apoptosome avec Apaf-1 et la caspase 9, puis cette dernière active

les caspases effectrices 3 et 7. B. Voie extrinsèque. La liaison du Fas ligand sur son récepteur Fas entraîne la fixation de l'adaptateur FADD et de la caspase 8 sur son domaine intracellulaire. Après un clivage autocatalytique, la caspase 8 peut activer les caspases effectrices. Les deux voies aboutissent à l'apoptose. Tirée de (90).

1.3.3.3 BAP1 est modifié suite aux dommages à l'ADN

Il a été démontré plus haut, que l'une des cascades de signalisation les plus précoces qui se mettent en place suite à la détection de lésions au niveau de l'ADN est l'activation des kinases ATM et ATR. Ces deux kinases, dépendamment du type de lésion, vont phosphoryler une pléiade de protéines incluant des transducteurs de signal, des médiateurs ou des effecteurs. Tous des acteurs importants qui vont participer aux réponses des cellules aux dommages à l'ADN.

Nous avons vu également que ces réponses concernent essentiellement l'activation et le maintien des points de contrôle du cycle cellulaire, l'activation des voies de réparation d'ADN ou l'activation des voies de l'apoptose. A cet égard, plusieurs études se sont penché sur l'identification des sites consensus pouvant être reconnus et phosphorylés par ATM/ATR et, dans la même optique, l'identification des substrats directs de ces deux kinases, véritables chefs d'orchestres de la réponse aux stress génotoxique. Un motif pSQ/TQ consensus a été identifié en se basant sur la phosphorylation de p53 et autres substrats (91), et confirmé récemment par d'autres études de protéomique à grande échelle (92,93).

BAP1 a été identifié dans ces études comme étant l'un des substrats potentiels des protéines ATM et/ou ATR suite aux stress génotoxique (IR, UVC), et un site de phosphorylation en particulier a été mis en avant comme étant la cible de ces deux kinases suite au traitement par les UVC ou les radiations ionisantes. Ce site est la sérine S592, faisant partie du fameux motif SQ (92,93). Ces résultats suggèrent une action directe de ces PIKKs sur BAP1 suite aux dommages à l'ADN et nous laissent donc croire que BAP1 a un rôle à jouer en réponse au stress génotoxique.

En revenant en arrière, souvenons nous que BAP1 a été identifiée en premier lieu pour son interaction avec BRCA1 (51). De plus, les résultats d'une étude parue en 2008 suggèrent que BAP1 peut interférer avec l'activité E3 ligase de l'hétérodimère BRCA1-BARD1, deux protéines qui jouent un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN, en l'occurrence, la réparation par recombinaison homologue (54). Ces deux éléments nous poussent pour croire que BAP1 peut être liée d'un point de vue

fonctionnel à ces deux protéines pour participer à la réponse au stress génotoxique. Surtout que selon cette même étude, la déplétion de BAP1 augmente la sensibilité des cellules aux radiations ionisante (54).

Néanmoins, d'autres éléments peuvent orienter notre pensée vers d'autres voies de fonctionnement. En effet, selon *Yu et al.*, une expérience d'immunodéplétion montre bien que BAP1 est totalement complexé à la protéine HCF, avec laquelle elle forme un complexe transcriptionnel stable, et au sein duquel, se trouvent incorporées plusieurs autres protéines associées à la chromatine et à la transcription en général (57). D'autres part, d'autres études clament un rôle de BAP1 totalement indépendant de BRCA1, du fait que de point de vue biochimique et phénotypique, ils n'ont pas pu reproduire un lien entre les deux protéines (26). Cependant, cette controverse devra continuer à alimenter les études qui se penchent sur le lien éventuel entre BAP1 et BRCA1.

1.4 Hypothèse et objectifs

Il est devenu bien établi à ce stade que BAP1 est une déubiquitinase dont la localisation nucléaire et l'activité enzymatique lui confèrent une fonction de suppression tumorale, et que les différentes délétions et réarrangements observés au niveau de son locus, dans plusieurs types de cancers, viennent appuyer ce rôle.

Une autre évidence concerne l'interaction physique et fonctionnelle entre BAP1 et le cofacteur de transcription HCF. BAP1 se trouve majoritairement dépendant de ce partenaire pour participer à la régulation de l'expression génique et de la prolifération cellulaire. En nous basant sur les études réalisées à ce jour sur cette enzyme, nous devons donc prendre en considération l'importance du contexte transcriptionnel dans lequel BAP1 agit au niveau du noyau de la cellule, pour réguler le ou les différents processus cellulaires.

L'autre observation qui attire l'attention, est que BAP1 est un substrat potentiel des kinases ATM et ATR suite aux radiations ionisantes et les UVC, respectivement. En sachant que ces modifications post-stress ne sont pas arbitraires - constituant au contraire un signal amorçant la mise en place de mécanismes régulant le cycle cellulaire, la réparation d'ADN ou l'apoptose – et que la déplétion de BAP1 augmente la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes, il devient alors très probable que BAP1 a un rôle à jouer en réponse aux dommages à l'ADN.

En nous basant sur tous ces éléments, nous avons émis l'hypothèse que BAP1 est impliquée dans la réponse des cellules au stress génotoxique, et que des modifications spécifiques de BAP1 tel que la phosphorylation, jouent un rôle dans la régulation de sa fonction.

Partant de cette hypothèse, mon projet de maîtrise avait comme objectifs de bien caractériser, en premier lieu, les modifications post-traductionnelles de BAP1 suite aux dommages à l'ADN, en l'occurrence sa phosphorylation, et surtout étudier leur impact sur BAP1: d'un côté, en tant que protéine enzymatique possédant une activité déubiquitinase, et de l'autre côté, en tant que complexe multiprotéique régulant la transcription. Néanmoins, l'objectif principal de ce projet consiste à identifier un rôle éventuel de BAP1 dans la régulation de l'une des réponses des cellules aux dommages à l'ADN et surtout d'en élucider le mécanisme.

2.MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Plasmides et anticorps

Les constructions rétrovirales portant la double étiquette Flag-HA et qui expriment la forme sauvage ou les mutants de BAP1 ont été générées par sous-clonage de l'ADNc dans le plasmide POZN fourni par Y.Nakatani (94). La construction de BAP1 inactif POZBAP1 (C91S) a été générée par mutagenèse dirigée (57). La construction de BAP1 délétée de la séquence NHNY correspondant à la région de liaison à HCF (-HBM) a été générée comme décrit précédemment (57). La construction de BAP1 inactif, délétée de la séquence HBM a été générée dans notre laboratoire (C91S-HBM). Les petites épingles à cheveux d'ARN (shRNA) pour BAP1 humain hBAP1 ont été générées comme décrit précédemment (57). La séquence cible est GGTTTCAGCCCTGAGAGCAAAG.

Les anticorps monoclonaux anti-BAP1 (C4), anti-YY1 (H10), anti-p53 (DO1), anti-PARP (F2) et l'anticorps polyclonal anti-OGT (H300) sont fournis commercialement par Santa Cruz. Les anticorps monoclonaux anti-phosphoH2AX (3F2), β -actin (MAB1501) sont fournis par Millipore. Les anticorps polyclonaux anti-phosphoBAP1 (#9373) et anti-phosphoH3 (#9701) sont fournis commercialement par Cellsignaling. Les anticorps polyclonaux anti-HCF (A301-400A) et anti-ASXL2 (A302-037A) sont fournis commercialement par les laboratoires Bethyl. L'anticorps anti-BrdU conjugué à un anti-Alexa 488 est fourni commercialement par Invitrogen.

2.2. Culture cellulaire, ARN interférence et immunobuvardage:

Les cellules du cancer cervical HeLa, les cellules d'ostéosarcome U2OS et les cellules productrices de virus 293-GPG sont maintenues en culture dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté de 10 % du serum fœtal bovin (FBS) et de 1 % de streptomycine-pénicilline.

Pour les expériences de transfection transitoire, les cellules sont transfectées par un plasmide portant soit un shRNA contrôle (GFP muté) soit un shRNA pour BAP1. Ces plasmides sont co-transfectés avec le plasmide pBABE portant un gène de résistance à la puromycine. Les cellules transfectées sont sélectionnées par 2 μ g/ml pendant deux jours comme décrits précédemment (96).

Pour les expériences utilisant les petits ARN interférents pour BAP1 (smart pool) ou le contrôle sans cible (Dharmacon), les cellules sont doublement transfectées à 24 h d'intervalle. Toutes les transfections se font par la Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Pour l'immunobuvardage, les extraits cellulaires totaux sont préparés dans le tampon de lyse (50 mM Tris-HCl [pH 7.3], 5 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM dithiothreitol [DTT], et un cocktail d'inhibiteurs de protéases [Sigma]). Le dosage de la quantité de protéine se fait par la méthode de Bradford et les échantillons sont analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et immunobuvardage selon les procédures standards et en utilisant les anticorps indiqués pour chaque expérience.

2.3. Identification des sites de phosphorylation de BAP1 et des protéines qui lui sont associées:

Des lignées de cellules du cancer cervical HeLa exprimant stablement Flag-HA-BAP1 ou un vecteur vide ont été générées suite à une transduction rétrovirale et 4 tris de sélection utilisant les billes magnétiques comme décrit précédemment (94).

3 x 10⁹ cellules pour chaque condition: contrôle exprimant un vecteur vide, NT exprimant Flag-HA-BAP1 et non traitées, IR exprimant Flag-HA-BAP1 et collectées 3 h après une dose de 10Gy et UVC exprimant Flag-HA-BAP1 et collectées 3 h après une dose de 30 J/m² ont été utilisées pour la purification des protéines associées à BAP1 (voir figure 16.) comme décrit précédemment (97).

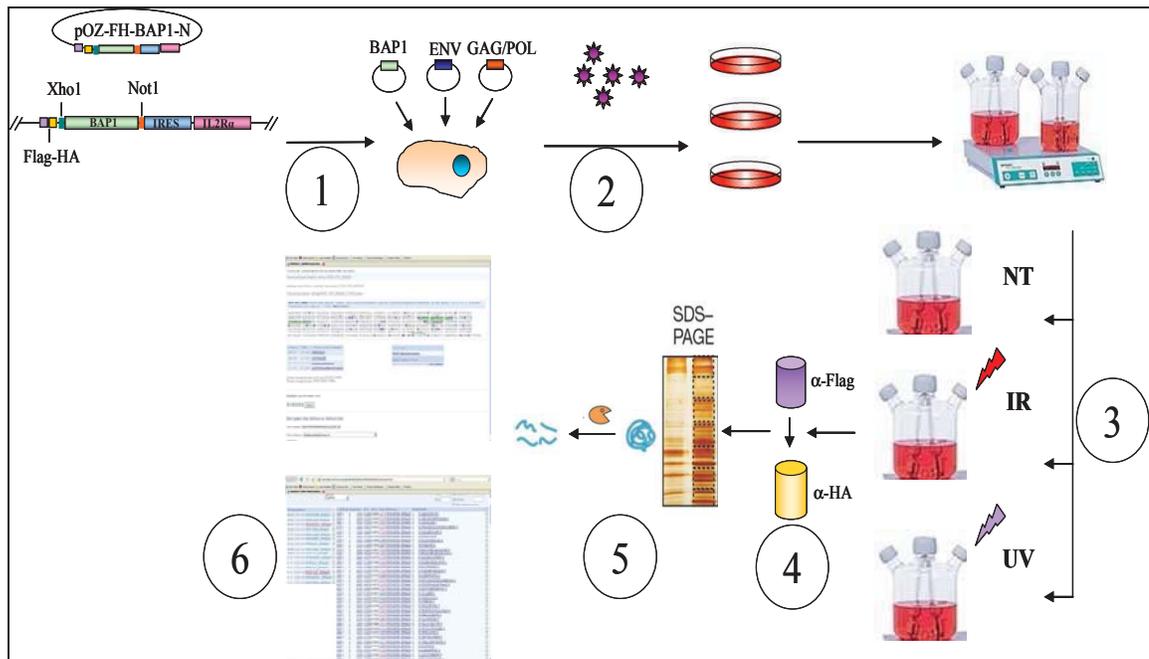


Figure 16. Stratégie pour la purification des protéines associées à BAP1 dans les conditions de stress génotoxique. 1. Construction rétrovirale de la protéine BAP1 liée à la double étiquette Flag-HA. 2. Etablissement par infection rétrovirale suivie de tris de sélection d'une lignée stable exprimant Flag-HA-BAP1. 3. Les lignées exprimant BAP1 étiqueté versus un vecteur vide sont mises dans les différentes conditions indiquées. 4. Double immunopurification utilisant des colonnes portant respectivement les anticorps anti-Flag et anti-HA. 5. Les éluats sont analysés par SDS-PAGE et les bandes sont coupées, trypsinisées et soumis séquençage par spectrométrie de masse 6. Identification des protéines associées à BAP1 ainsi que les sites phosphorylations de BAP1.

L'analyse par spectrométrie de masse pour l'identification des sites de phosphorylation de BAP1 et des protéines qui lui sont associées a été réalisée par la plateforme spectrométrie de masse et protéomique du Harvard medical school.

2.4. Essai d'interaction avec la sonde ubiquitine activée

Les protéines éluées suite à l'immunoprécipitation par les colonnes anti-HA (purification des protéines associées à BAP1) correspondant à chaque condition (Mock, NT, IR et UV) ou les extraits cellulaires totaux des cellules HeLa ou U2OS traitées par les radiations ionisantes (5 Gy) ou les UVC (8 Joules) pendant les intervalles de temps indiqués sont mis en présence ou en absence de la sonde HA-Ub-VME (groupement Venyl-Méthyl-Ester monoubiquitiné et lié à l'étiquette HA) dans un tampon de réaction (Tris 50 mM pH 7,3; MgCl₂ 10 mM; DTT 5 mM; ATP 100 mM). La réaction dure 1 h à température ambiante puis elle est arrêtée par un volume égal du tampon d'échantillon

LB2X (Loading Buffer). Les échantillons sont analysés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-BAP1.

2.5. Marquage par immunofluorescence:

Les cellules sont fixées pendant 20 minutes par 3 % de paraformaldéhyde (préparée dans le tampon sel de phosphate PBS). Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 15 minutes par un tampon PBS contenant 0,5 % de NP-40. Après un lavage avec un tampon PBS contenant 0,1 % de NP-40, les cellules sont incubées avec une solution de blocage (PBS contenant 0,1 % de NP-40 et 10 % de FBS). Les noyaux sont marqués par le 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). BAP1 est marqué par l'anticorps monoclonal anti-BAP1 suivi par un anticorps secondaire anti-souris conjugué au colorant fluorescent Alexa-fluor 594 (Invitrogen). BAP1 phosphorylé à la sérine 592 est marqué par l'anticorps polyclonal anti-phosphoBAP1 (Ser592) suivi par une incubation avec un anticorps secondaire anti-chèvre conjugué à un colorant fluorescent Alexa-fluor 488 (Invitrogen). Les images ont été prises par un microscope Leica DMRE avec un objectif HCX PL APO 63 et une caméra Retiga EX (Qimaging) et l'analyse se fait par le programme Openlab 3.1.1.

2.6. Analyse du cycle cellulaire et essais de cytométrie en flux:

Les cellules U2OS ou H226 sont collectées par trypsinisation puis fixées par 70 % d'éthanol. Après un lavage au PBS, les cellules sont traitées avec 100ug/ml RNase A (Sigma-Aldrich) pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite marquées par 50ug/ml d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich). Pour le marquage du BrdU, les cellules sont traitées avec 20 uM de BrdU (Sigma-Aldrich) pendant 2h à 37°C puis fixées avec 70 % éthanol. Après un lavage au PBS, les cellules sont traitées avec d'acide chlorhydrique 2N pour 30 min à température ambiante puis neutralisées avec du Borax 0,1 M. Les échantillons sont ensuite lavés avec 0,5 % Tween20 / 1 % BSA dans du PBS et marqués par l'anticorps anti-BrdU conjugué à l'anti-goat couplé à l'Alexa-fluor 488 pendant 2 h à température ambiante. Les cellules sont ensuite traitées par la RNase A et l'iodure de propidium. Pour quantifier les cellules mitotiques, les cellules fixées sont marquées par l'anticorps anti-phosphoH3(Ser10) pendant 2 h à température ambiante puis par l'anti-chèvre couplé à Alexa-fluor 488 pour 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite traitées par la RNase A et l'iodure de propidium. Le même

protocole s'applique pour le marquage des cellules exprimant BAP1. Les échantillons sont analysés par les machines FACScan ou FACScalibur et le logiciel CellQUEST PRO (Becton Dickinson).

3. RÉSULTATS

3.1. BAP1 est phosphorylé suite au stress génotoxique et cette phosphorylation se prolonge à des intervalles de temps longs

Nous avons vu plus haut que suite à la détection de lésions au niveau de l'ADN, la phosphorylation d'une pléiade de protéines clés par les kinases ATM et/ou ATR est un événement crucial dans la transduction de signal qui va activer les points de contrôles du cycle cellulaire et la réparation d'ADN. Nous avons vu, dans ce contexte également, qu'au moins deux études de protéomique à grande échelle ont identifié le site S592 comme un motif SQ potentiellement phosphorylé après les radiations ionisantes et les UVC.

A cet égard, et en se basant sur ces études, un tout nouveau anticorps a été conçu et mis sur le marché et qui reconnaît la protéine BAP1 phosphorylée spécifiquement au niveau de la sérine S592. A cet effet, nous avons voulu vérifier spécifiquement cette phosphorylation et en étudier la cinétique. Pour ce faire, nous avons traité des cellules d'ostéosarcome U2OS par les radiations ionisantes à une dose de 5Gy et nous pouvons voir, en utilisant cet anticorps, que ce soit par immunofluorescence (figure 17 A) ou par immunobuvardage (figure 17 B), que la phosphorylation de BAP1 au niveau de ce site est induite, déjà 2 heures suite au traitement. L'étude d'une cinétique plus prolongée a révélé que cette phosphorylation de BAP1 pouvait se poursuivre au moins jusqu'à 48 heures post-traitement (figure 17 C).

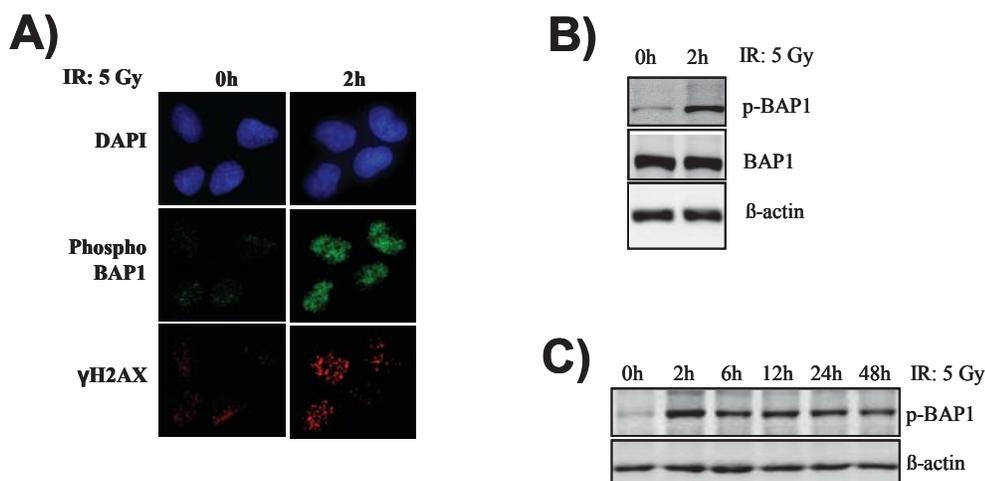


Figure 17. La phosphorylation de BAP1 est induite par le stress génotoxique et se prolonge à des intervalles de temps longs. Les cellules U2OS ont été traitées par les radiations ionisantes à une dose de 5 Gy pour les périodes de temps indiquées. A) Les cellules U2OS ont été traitées comme décrit puis fixées après 0h ou 2h pour marquage par immunofluorescence: le noyau est coloré en bleu par le DAPI, BAP1 phosphorylé est coloré en vert et γ H2AX, utilisé comme contrôle positif, est coloré en rouge. B) Les cellules U2OS, traitées comme dans A) sont collectées pour un buvardage de type Western en utilisant les anticorps indiqués. C) Les cellules U2OS traitées comme dans B) et à des intervalles de temps allant jusqu'à 48h sont collectées pour un buvardage de type Western en utilisant les anticorps indiqués.

Ces résultats confirment que la phosphorylation de BAP1, au niveau d'un motif SQ à la position 592, est induite par le stress génotoxique. Ces résultats montrent aussi que cette phosphorylation se prolonge sur de longs temps.

3.2. BAP1 est hyperphosphorylé en réponse aux dommages à l'ADN

Bien que les études de protéomique conduites à grande échelle soient extrêmement utiles dans le sens qu'ils offrent une vue globale, que ce soit sur les réseaux d'interaction protéine-protéine ou sur les modifications post-traductionnelles, elles n'arrivent pas à donner des informations détaillées et identifier toutes les modifications critiques sur une protéine particulière. Ceci peut être en partie expliqué par le fait qu'un score de recouvrement est généralement bas pour beaucoup de peptides et de protéines présents dans l'extrait protéique. Afin de compléter et d'approfondir nos connaissances sur la phosphorylation de BAP1 dans des conditions de stress génotoxique, et nous basant sur le fait que dans la plupart des cas, ce type de modification ne touche pas des sites

uniques, mais plusieurs qui s'entre-régulent, nous avons voulu opérer ce genre d'analyses sur des extraits cellulaires plus enrichis en BAP1 pour pouvoir couvrir le maximum de sites éventuels. Pour ce faire, nous avons réalisé une immunoprécipitation de BAP1 à grande échelle à partir de cellules HeLa, traitées par les radiations ionisantes et les UVC et collectées 3h plus tard. Par la suite, une analyse par spectrométrie de masse à été réalisée en coopération avec le Dr S. Gygi du Harvard Medical School. En plus du fait que BAP1 soit phosphorylé au niveau basal dans des cellules non synchronisées (Figure 18 B), nous avons été surpris de voir que BAP1 était hyperphosphorylé suite aux dommages à l'ADN et que les profils de phosphorylation, quoique chevauchants, présentaient une réelle spécificité avec le type de traitement endommageant (Figure 18 A).

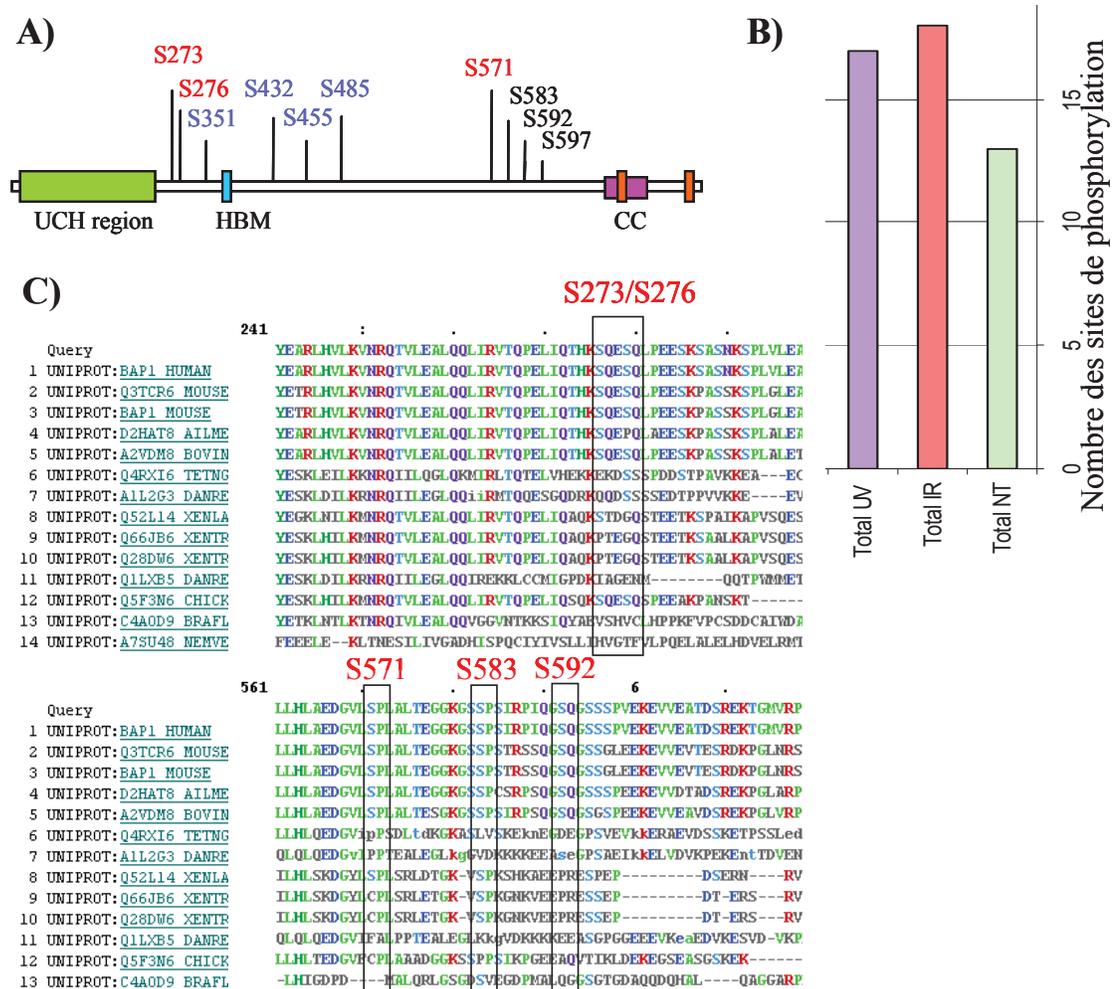


Figure 18. BAP1 est hyper-phosphorylé suite aux dommages à l'ADN. A) Les sites de phosphorylation de BAP1 dans différentes conditions de stress génotoxique par rapport au contrôle sont identifiés par spectrométrie de masse. Les sites en rouge sont phosphorylés suite aux radiations ionisantes, les sites en bleu sont phosphorylés suite aux radiations ultra-violetes et les sites en noir sont phosphorylés dans les deux conditions. B) Histogramme montrant les niveaux de phosphorylation de

BAP1 dépendamment des conditions de traitement. C) Alignements des régions de BAP1 montrant les sites de phosphorylation les plus conservés.

En plus du site S592, l'analyse par spectrométrie de masse a pu révéler d'autres sites critiques à motif SQ dont le site S273 (figure 18 A). L'alignement de ces sites de phosphorylation montre que leur conservation remonte au plus à l'espèce poulet suggérant un rôle plus ou moins récent de ces modifications dans la régulation de BAP1 et donc une plus grande complexité dans sa fonction (figure 18 C). Ces résultats ne sont en aucun cas concluants et nous incitent à vérifier la phosphorylation effective au niveau de ces sites suites au stress génotoxique ainsi que la nature de leur implication dans la régulation fonctionnelle de BAP1.

En conclusion, nous avons pu identifier de nouveaux sites de phosphorylation de BAP1. Ces résultats suggèrent que BAP1 est phosphorylé au niveau basal et que ce profil de phosphorylation change dramatiquement suite aux stress génotoxique et d'une manière différentielle par rapport aux types de traitement endommageant.

3.3. Le stress génotoxique n'altère pas la composition des complexes protéiques solubles qui contiennent BAP1

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent que BAP1 est nettement affectée par les dommages à l'ADN, et que cet effet se traduit par un changement dramatique des niveaux et des profils de phosphorylation de cette protéine.

Nous nous sommes posé la question sur les conséquences de ce changement. BAP1 est une protéine qui se trouve impliquée au cœur de complexes multiprotéiques de hauts poids moléculaires à vocation transcriptionnelle (57). Les protéines associées à BAP1 sont pour la plupart des facteurs ou des cofacteurs de transcription, ainsi que des protéines associées à des processus chromatiniens en général. Il est établi que les modifications post-traductionnelles en général, et la phosphorylation en particulier, participent à la régulation des protéines à travers plusieurs mécanismes. L'un des plus importants est l'altération des interactions protéine-protéine. Ce type de régulation est très important car il permet, selon la voie de signalisation activée, d'exclure d'anciens partenaires, d'en recruter de nouveaux ou de changer de substrats, etc.

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si, les dommages à l'ADN, induisant la phosphorylation de BAP1, peuvent altérer le profil des protéines associées à BAP1. En

d'autres termes, est ce que les dommages à l'ADN permettent à BAP1 de s'associer à de nouvelles protéines et/ou de se libérer de ses partenaires déjà connus. Ce type d'analyse est d'une importance capitale car la caractérisation des "complexes BAP1" dans différentes conditions aiderait en quelque sorte à cerner les voies ou les processus que BAP1 pourrait réguler. A cet égard, nous avons conduit une purification des protéines associées à BAP1 dans des conditions normales versus des conditions de stress génotoxique. Cette étape a consisté à réaliser une double immunoprécipitation à grande échelle de BAP1 liée à la double étiquette Flag-HA, à partir de cellules HeLa non traitées, des cellules traitées par des radiations ionisantes (10 Gy) ou des UVC (30 J/m²) pendant 3 heures (Voir figure 16 au chapitre 2). Avant d'entamer l'immunopurification, nous avons vérifié que le traitement, réalisé à grande échelle était efficace. Nous avons ainsi vérifié par cytométrie en flux que, 24 heures après les radiations ionisantes, les cellules sont bloquées en phase G2/M, et que les UVC induisent l'apparition d'une large population apoptotique (figure 19 A).

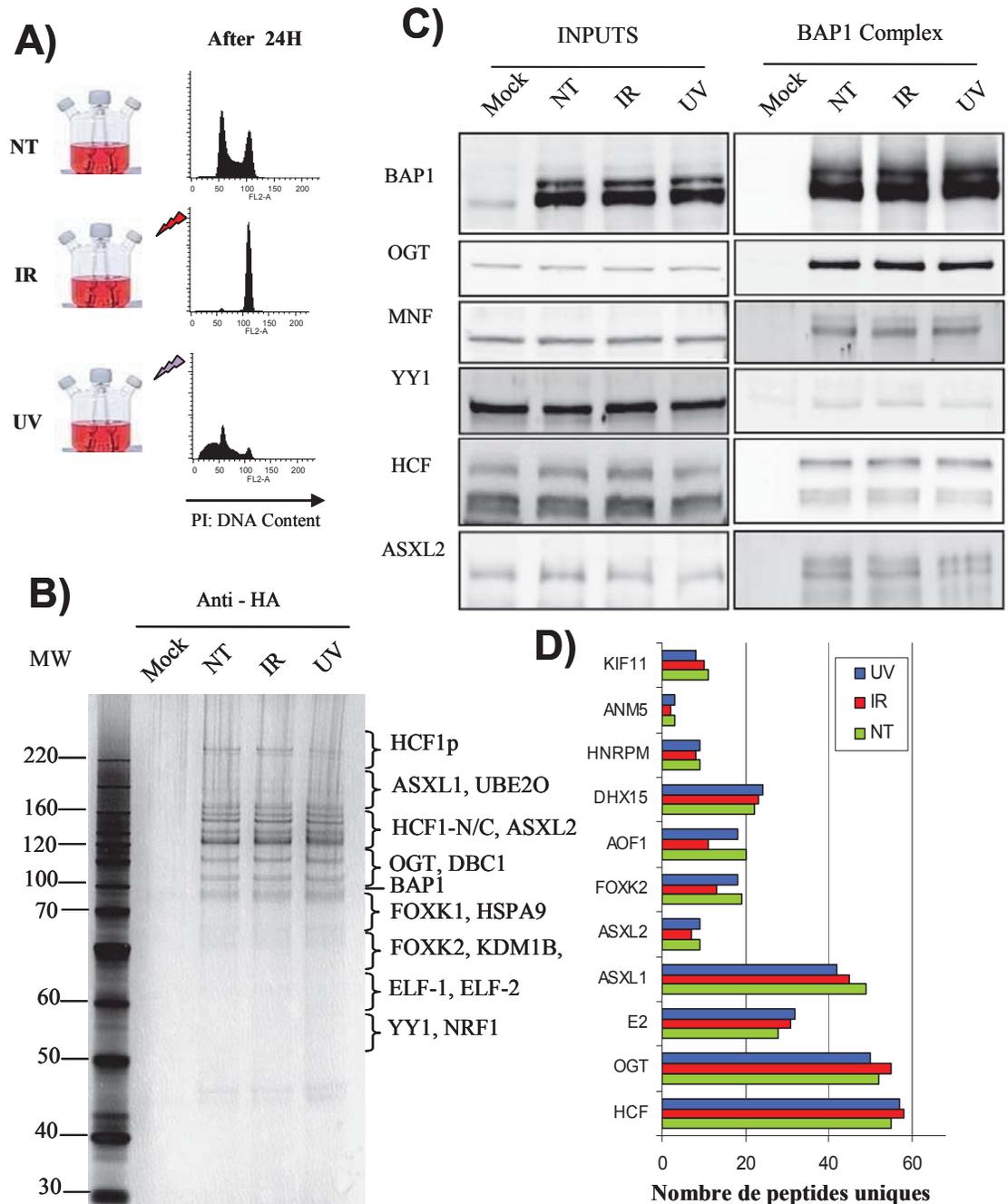


Figure 19. Le stress génotoxique n'altère pas la composition des complexes protéiques solubles qui contiennent BAP1. Purification des protéines associées à BAP1: Une lignée de cellules HeLa exprimant d'une manière stable Flag-HA-BAP1 a été mise dans des conditions différentes de stress génotoxique (NT: Non Traitée, IR: Radiations Ionisantes à une dose de 10 Gy, UV: Radiations Ultra-Violet UVC à une dose de 30 joules/m²). A) L'effet des différents traitements sur le cycle cellulaire vérifié après 24h par cytométrie en flux. B) 3h après les traitements, les cellules sont collectées pour une double immuno-purification séquentielle utilisant un anticorps anti-Flag suivi d'un anticorps anti-HA. Suite à la deuxième immuno-précipitation, les protéines éluées sont séparées par SDS-PAGE et révélées par une coloration au nitrate d'argent. La purification contrôle (Mock) a été réalisée en utilisant une lignée cellulaire exprimant un vecteur vide. C) Les extraits totaux (Inputs) ainsi que les protéines éluées sont analysées

par buvardage de type Western en utilisant les anticorps indiqués. D) Des régions du gel coloré sont coupées et envoyées pour être séquencées par spectrométrie de masse. Le nombre de peptides uniques correspondants à chaque protéine est représenté sur le graphe en fonction des conditions de traitement.

Après l'immunoprécipitation réalisée respectivement par des immunocolonnes Flag et HA, l'éluât est analysé par SDS-PAGE et le gel est coloré par le nitrate d'argent. L'analyse visuelle des bandes au niveau du gel montre un profil protéique identique entre les différentes conditions de traitement (figure 19 B). L'analyse par spectrométrie de masse vient confirmer ce constat en identifiant d'une manière consistante les mêmes protéines dans les trois contextes de traitement (figure 19 D). Par immunobuvardage, nous avons voulu vérifier les niveaux d'expression des composants majeurs des "complexes BAP1" connus jusque là. Le partenaire principal HCF, le facteur de transcription YY1, et la protéine ASXL2 ne semblent pas changer au niveau de leur association avec BAP1 (figure 19 C). En résumé, ces résultats suggèrent que le stress génotoxique, et les modifications de BAP1 qui en découlent ne viennent pas altérer la composition, du moins majeure des "complexes BAP1". Ce constat montre que la phosphorylation ne joue apparemment pas au niveau des interactions protéine-protéine et que les "complexes BAP1" solubles restent intacts sous l'effet des dommages à l'ADN.

3.4. Les dommages à l'ADN n'affectent pas la disponibilité de BAP1 et sa liaison à l'ubiquitine

BAP1 est une déubiquitinase de la famille des UCHs (voir chapitre 1). Beaucoup d'études montrant la régulation de ces enzymes par les modifications post-traductionnelles suggèrent par exemple un rôle de la phosphorylation sur le blocage du site actif, un blocage qui affecte directement sa conformation et par conséquent sa disponibilité par rapport à l'ubiquitine.

A défaut de voir un rôle de ces modifications post-dommages au niveau des associations protéiques, nous avons alors voulu vérifier leur effet possible sur l'activité enzymatique de BAP1. Est-ce que la phosphorylation de BAP1, induite par les stress génotoxique, pourrait par exemple rendre le site actif indisponible et moins apte à capter et fixer une molécule d'ubiquitine? Pour répondre à cette question, nous avons conduit une réaction *in vitro* entre les différents éluâts (complexes BAP1) purifiés dans les différentes conditions de traitement, et une sonde chimique qui correspond à une molécule

d'ubiquitine chimiquement modifiée (voir paragraphe 2.4 et figure 20 A), Cette sonde permet la fixation de la molécule d'ubiquitine sur le site actif de la déubiquitinase d'une manière irréversible et ceci permet donc, de visualiser cette fixation par immunobuvardage. La migration plus lente de BAP1 traduit une fixation de l'ubiquitine sur le site actif de l'enzyme et donc une conformation active et ouverte de BAP1. Le cas contraire traduit une fermeture et un blocage au niveau du site actif rendant impossible l'attachement de la sonde (figure 20B). Des conditions normales de cellules non traitées montrent le même niveau de fixation de la sonde comparativement aux conditions de stress génotoxique qu'il soit induit par les radiations ionisantes ou les UVC (figure 20C).

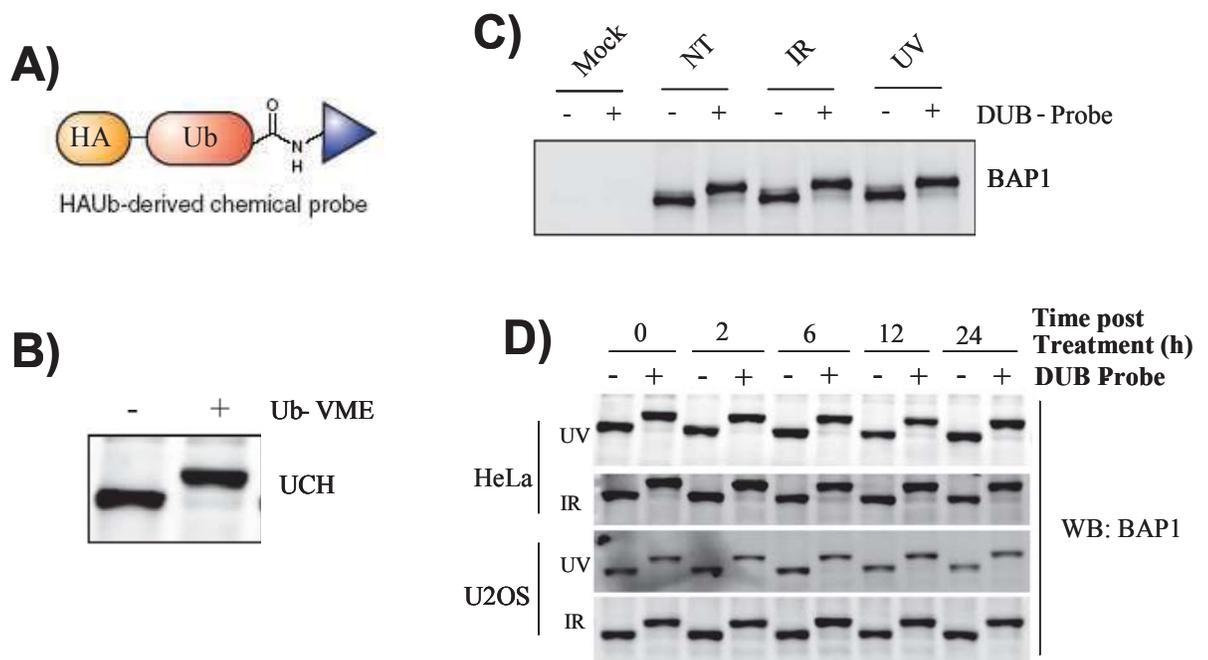


Figure 20. Les dommages à l'ADN n'affectent pas la disponibilité de BAP1 et sa liaison à l'ubiquitine. A) schéma illustrant la composition de la sonde chimique HAUb-VME pour Ubiquitin-VenylMéthylEster, liée à une étiquette HA et qui se lie à un site catalytique ouvert et disponible d'une déubiquitinase. B) BAP1 est mise en présence ou en absence de la sonde pendant 1h à température ambiante puis la réaction est arrêtée avec le tampon d'échantillon. Les réactions sont analysées par un buvardage de type Western en utilisant l'anticorps adéquat. On peut noter que l'enzyme ayant incorporé la sonde migre plus lentement au niveau du gel d'acrylamide. C) BAP1 purifiée avec les protéines qui lui sont associés, dans les différentes conditions de stress génotoxique, est mise en présence ou absence de la sonde, puis les réactions sont analysées par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-BAP1. D) Des cellules HeLa et U2OS subissent des traitements de radiations ionisantes (10 Gy) et ultra-violetes (8J/m²) puis sont collectées aux temps indiqués. Les extraits protéiques sont mis en présence ou en absence de la sonde puis les réactions sont analysées par immunobuvardage pour visualiser BAP1.

La purification de complexe, requiert des conditions d'extraction, de séparation et de centrifugation qui peuvent affecter certaines propriétés et caractéristiques des protéines et des enzymes présente dans le milieu réactionnel. Et bien que toutes les étapes ont été réalisées en utilisant des tampons qui préservent au maximum les modifications post-traductionnelles des protéines et leur stabilité (anti phosphatases, anti protéases), nous voulions confirmer ce résultat en réalisant le même essai sur des extraits cellulaires totaux. Ainsi nous avons traité des cellules U2OS et des cellules HeLa par des radiations ionisantes (5 Gy) et des UVC (8 J/m²) et nous les avons collectées à tes intervalles de temps allant jusqu'à 24 heures. Les essais avec la sonde montrent que BAP1 est apte à incorporer la sonde pendant toute cette période suite aux dommages à l'ADN (figure 20 D).

Ces résultats montrent que les dommages à l'ADN n'altèrent pas la capacité de BAP1 à reconnaître et à s'attacher à l'ubiquitine, suggérant que son activité enzymatique reste intacte et n'est pas régulée par la phosphorylation induite par le stress génotoxique.

3.5. BAP1 régule la maintenance de l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire suite aux radiations ionisantes

La caractérisation biochimique de BAP1, en réponse aux dommages à l'ADN, a permis de constater, quoique d'une manière préliminaire, que cette protéine n'était pas altérée ou affectée, premièrement en tant que déubiquitinase, et deuxièmement en tant que complexes multiprotéiques. Restait donc à savoir quel était le rôle de BAP1, étant phosphorylée suite aux dommages à l'ADN, au niveau phénotypique. En d'autre terme, et sur le plan méthodologique, comment agiront les cellules après un traitement par un agent génotoxique si BAP1 est absente ou déplétée. Afin de répondre à cette question, nous avons généré des cellules d'ostéosarcome U2OS qui expriment d'une manière stable un ARN interférent (shRNA) dirigé contre BAP1 versus un ARN interférent qui n'a aucune cible (GFP muté). Nous pouvons constater sur la figure 21 A une diminution dramatique du niveau d'expression de BAP1 par immunobuvardage. Ces cellules ont été ensuite traitées par les radiations ionisantes à une dose de 5Gy et collectées aux temps indiqués (figure 21 B). Le profil du cycle cellulaire montre un arrêt des cellules au niveau de la transition G2/M qui se fait d'une manière similaire entre les deux types de cellules. Cependant, à 24 heures post-traitement, nous pouvons voir une diminution dramatique de la population en G2/M des cellules déplétées en BAP1 par rapport aux cellules contrôles qui restent bloquées à ce niveau du cycle cellulaire (figure 21 B).

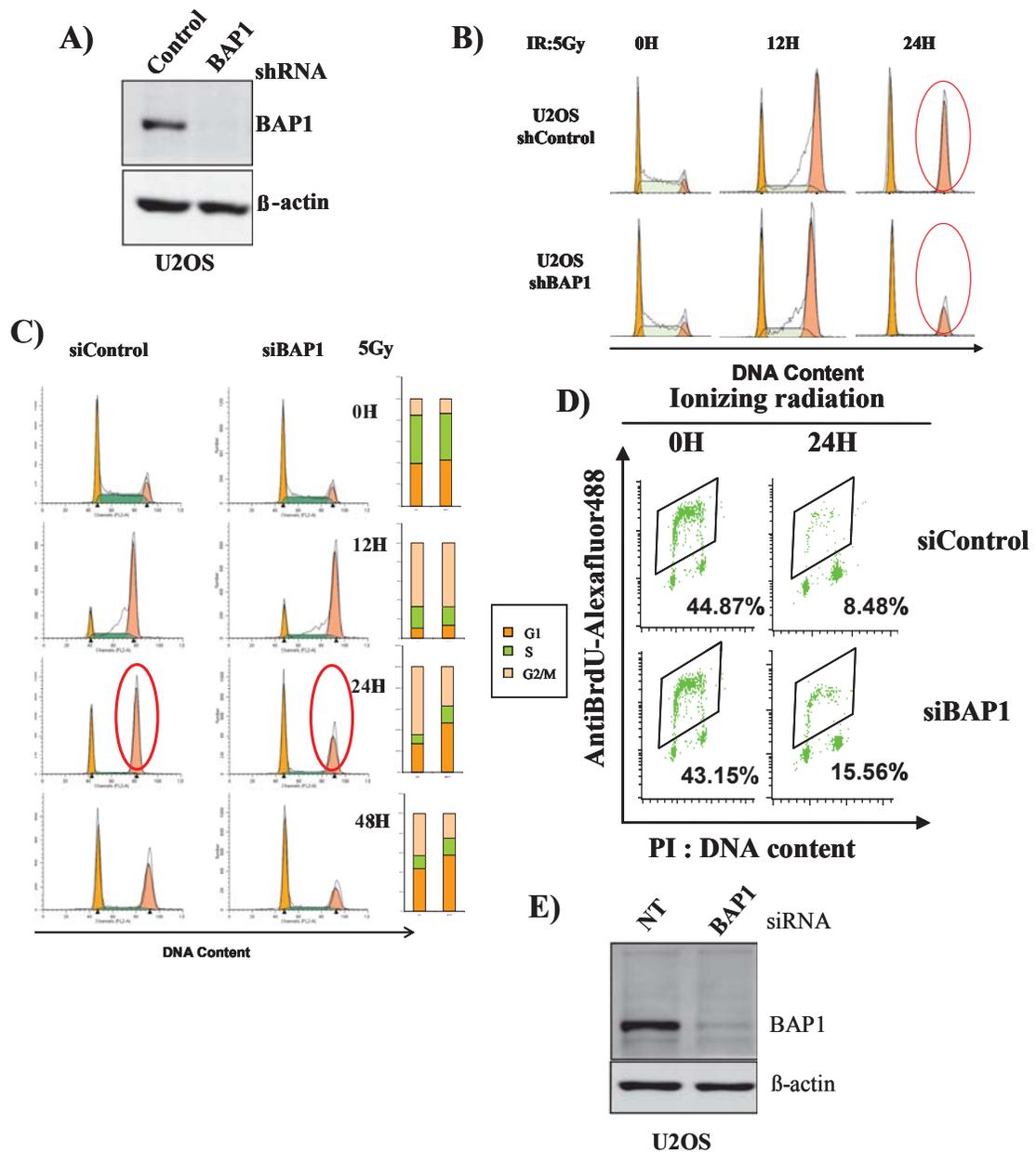


Figure 21. La déplétion de BAP1 cause un défaut dans la maintenance du point de contrôle du cycle cellulaire en phase G2 suite aux radiations ionisantes. A) Immunobuvardage montrant le niveau protéique de BAP1 dans une lignée d'U2OS exprimant d'une manière stable un shRNA dirigé contre la séquence de BAP1 versus une lignée exprimant un shRNA dirigé contre une séquence mutée de la protéine GFP. B) Les lignées décrites en A) sont traitées par les radiations ionisantes à une dose de 5 Gy puis collectées et fixées aux temps indiqués. Le profil du cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux. Le défaut au niveau du cycle cellulaire est entouré en rouge. C) Les cellules U2OS sont transfectées par un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre la séquence de BAP1, puis traitées 48h plus tard comme en B) et fixées aux temps indiqués. Le profil du cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux. D) Les cellules transfectées et traitées comme en C) avec incorporation de BrdU sont fixées aux temps indiqués et un double marquage est réalisé pour l'incorporation de BrdU et la quantité d'ADN. L'analyse se fait par cytométrie en flux et le pourcentage de cellules incorporant

le BrdU est indiqué en bas à droite de chaque fenêtre d'analyse. E) Immunobuvardage montrant l'effet du siBAP1 comme décrit en C) sur le niveau protéique de BAP1.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons inhibé l'expression de BAP1 en utilisant un mélange de petits ARN interférents dirigés contre quatre régions différentes de la séquence de BAP1 (siRNA smart pool). Ce type d'approche permet d'une part, d'augmenter l'efficacité d'inhibition et d'autre part, de diminuer significativement les effets non spécifiques des ARN interférents classiques utilisés précédemment. Ainsi la déplétion de BAP1 par siRNA diminue significativement son niveau d'expression (figure 21 E) et nous a donc permis de réaliser la même expérience de traitement par les radiations ionisantes. Les résultats obtenus viennent confirmer que la déplétion de BAP1 ne présente aucun effet sur l'induction de l'arrêt en phase G2/M, observée à 12 heures post-traitement, mais agit d'une manière significative sur le maintien de cet arrêt (24 heures post-traitement) et donc la reprise du cycle cellulaire suite à l'activation du point de contrôle en G2/M (figure 21 C). Afin de nous assurer d'un effet sur la maintenance du point de contrôle et donc sur la reprise du cycle cellulaire, nous avons réalisé la même expérience en utilisant l'approche siRNA "smart pool", et en incorporant dans le milieu de culture le BrdU. Cette approche nous permet de quantifier la population cellulaire entrant en réplication, et donc reprenant un cycle cellulaire normal. Consistants avec les résultats précédents, les résultats montrent une population de cellules contrôles incorporant le BrdU deux fois plus petite que les cellules déplétées en BAP1 24 heures après les irradiations (figure 21 D).

Tous ces résultats suggèrent que la déplétion de BAP1 induit un défaut dans la maintenance du point de contrôle du cycle cellulaire en phase G2 et une reprise plus rapide de la prolifération suite aux radiations ionisantes.

3.6. Le rôle de BAP1 dans la maintenance du point de contrôle en G2/M serait indépendant de l'interaction avec HCF

BAP1 est une déubiquitinase complexée principalement à HCF, ainsi que d'autres facteurs et cofacteurs de transcription. Les études précédentes montrent que la fonction de BAP1, que ce soit la régulation de la prolifération ou de la transcription, dépend d'une part, de son activité déubiquitinase, et d'autre part, de son interaction avec HCF (Voir chapitre 1). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que l'activité et les complexes BAP1 restent intacts. Afin de mieux comprendre les facteurs déterminants

dans sa fonction, nous avons utilisé des constructions mutantes de BAP1 afin de vérifier le rôle de l'activité catalytique et de l'interaction avec HCF dans le maintien du point de contrôle en G2/M régulé par BAP1. Ainsi, des cellules U2OS ont été infectées par un vecteur vide (POZ), une forme sauvage de BAP1 (WT), une forme catalytiquement inactive (C91S), une forme incapable d'interagir avec HCF (-HBM) et une forme catalytiquement inactive et incapable d'interagir avec HCF (C91S-HCF). Ces expériences d'infection transitoire permettraient ainsi de favoriser un effet dominant négatif (figure 22 A). En effet, la surexpression des ces formes à l'intérieur de la cellule induirait une compétition entre ces formes et la protéine cellulaire endogène, et favoriserait l'incorporation de ces formes mutantes dans les complexes multiprotéiques BAP1 et nous permettrait alors d'identifier quelle forme induirait un défaut dans la fonction attendue de BAP1. Bien que la surexpression de la forme sauvage semble avoir un effet dominant négatif, ceci peut être expliqué par un effet séquestrant sur les autres protéines qui interagissent avec BAP1 et donc un déséquilibre dans la stœchiométrie de ces protéines et leur répartition cellulaire

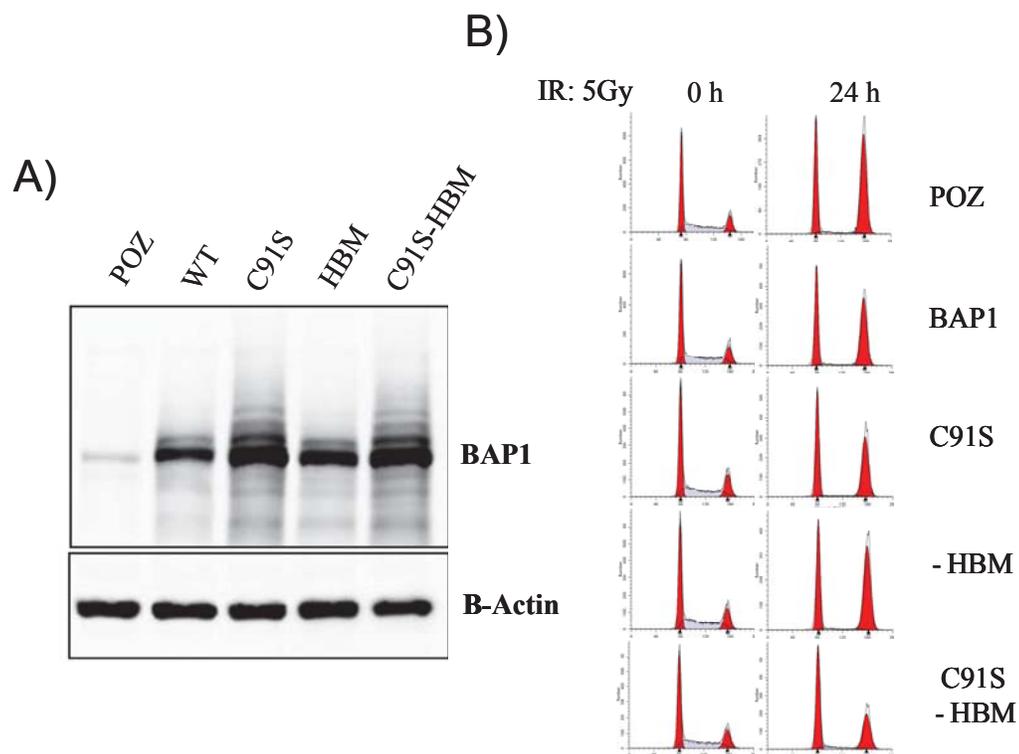


Figure 22. Le rôle de BAP1 dans le maintien de l'arrêt en G2 après les radiations ionisantes est indépendant de l'interaction avec HCF. A) Les cellules U2OS sont infectées par les différents mutants de BAP1 comme indiqué. 48h après, les cellules sont collectées pour un buvardage de type Western pour voir les niveaux d'expression de chaque construction. POZ est le vecteur vide, WT est la forme sauvage de BAP1,

C91S est la forme catalytiquement inactive, -HBM est une forme incapable d'interagir avec le cofacteur HCF et C91S-HBM est la forme inactive de BAP1 et incapable de se lier à HCF. B) Les cellules exprimant les constructions décrites en A) sont traitées par les radiations ionisantes à une dose de 5 Gy puis fixées aux temps indiqués pour analyser leur profil du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

Les cellules ainsi infectées sont traitées par les radiations ionisantes à une dose de 5Gy et collectées aux temps indiqués pour analyser leur profil du cycle cellulaire. 12 heures après le traitement, toutes les cellules sont arrêtées d'une manière similaire (Résultats non montrés). Cet arrêt se traduit par des populations cellulaires égales aux transitions G2/M et G0/G1. Cependant, la surexpression de la forme double-mutante (C91S-HBM) reprend plus rapidement le cycle cellulaire et sort plus rapidement de l'arrêt en G2/M. Ceci se traduit par une diminution dramatique de la population en G2/M et l'augmentation du nombre de cellules en G0/G1. Bien que la forme inactive seule présente un défaut similaire, il semble beaucoup moins dramatique que l'effet observé avec la forme inactive et incapable d'interagir avec la protéine HCF. Pour arriver à expliquer ce phénomène, il faudrait envisager l'incorporation des différentes formes dans les complexes multiprotéiques: La forme incapable d'interagir avec HCF est incapable d'interagir, en plus de HCF, avec une multitude d'autres protéines capables de former le complexe connu de BAP1 (résultats non montrés).

La surexpression de cette forme n'induit aucun défaut dans la maintenance du point de contrôle suite aux dommages. Par contre, la surexpression de cette forme mais inactive exerce un effet de dominant négatif. En plus du fait que l'activité catalytique soit requise pour la fonction de BAP1, ces résultats suggèrent que, contrairement aux autres processus dans lesquels BAP1 semble jouer un rôle, l'interaction avec HCF n'est pas nécessaire pour la maintenance du point de contrôle en G2/M suite aux radiations ionisantes.

3.7. Rôle de BAP1 dans la réponse des cellules aux rayons UVC

Ayant noté un effet significatif de BAP1 dans la réponse aux radiations ionisantes, nous voulions savoir s'il y avait une implication dans la réponse aux rayons UVC. Cette volonté est justifiée par le fait que BAP1 est aussi hyperphosphorylé suite aux UVC et notamment au niveau de motifs SQ (voir le paragraphe 3.2).

Ainsi, nous avons traité des cellules U2OS transfectées par des siRNA contrôles versus des "siRNA smart pool" dirigés contre BAP1, par des rayons UVC à une dose de 8 J/m^2 . Après un contact de 2 heures avec le BrdU aux temps indiqués (figure 23), nous les avons collectées pour analyser leur profil du cycle cellulaire par cytométrie en flux. D'après les résultats obtenus, la déplétion de BAP1 par la technique d'ARN interférence n'induit aucune différence avec les cellules non déplétées au niveau du point de contrôle G1/S, intra-S ainsi qu'au niveau de l'activation du point de contrôle en G2/M. Le maintien de l'arrêt en G2/M, quand à lui, n'a pu être vérifié vu que l'expérience s'est étalé jusqu'à 48 heures post-traitement (figure 23).

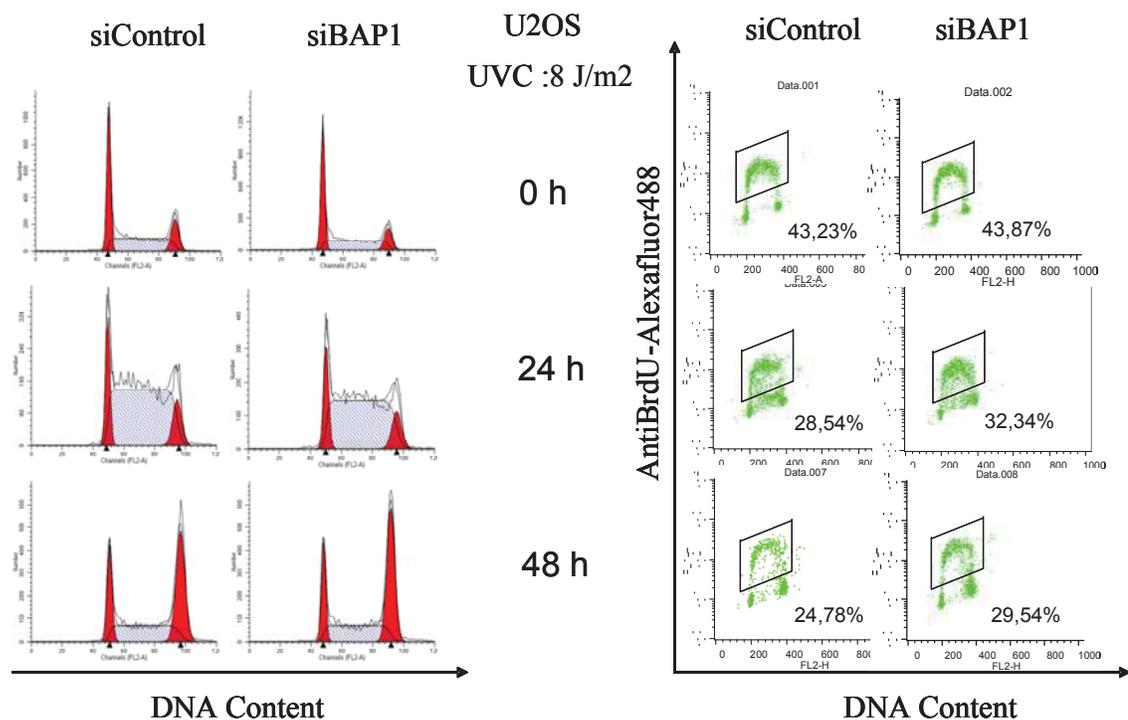


Figure 23. La déplétion de BAP1 dans les cellules U2OS n'a pas un effet notable sur le point de contrôle en G1/S, intra-S et l'induction de l'arrêt en G2/M suite à un traitement aux radiations UVC. Les cellules U2OS sont doublement transfectées par un siBAP1 ou siContrôle puis traitées par les UVC à une dose de 8 joules/m² en présence de 20uM de BrdU pendant 2H avant chaque collecte. 0h, 24h et 48h après les traitements, les cellules sont fixées pour analyser leur profil du cycle cellulaire (à gauche) et l'incorporation de BrdU (à droite).

En parallèle, et pour approfondir plus cette question, nous avons jugé pertinent d'utiliser un autre modèle cellulaire qui pourrait nous donner des réponses plus significatives. Ainsi, nous avons généré à partir des cellules issues d'un cancer du poumon H226, dont la protéine BAP1 endogène est tronquée et donc non fonctionnelle, des lignées qui expriment d'une manière stable un vecteur vide, versus une protéine BAP1 intacte et

fonctionnelle. Suite à cette reconstitution rétrovirale stable, nous avons traité ces deux lignées par des UVC à une dose de 30 J/m². Aux temps indiqués (figure 24 A), les cellules sont collectées pour un buvardage de type Western. Nous pouvons ainsi voir, en utilisant l'anticorps anti-BAP1, l'expression de BAP1 dans les cellules reconstituées versus les cellules non reconstituées et dont la protéine BAP1 n'est pas détectable par l'anticorps du fait qu'elle est tronquée et non fonctionnelle. L'expression de BAP1 n'affecte pas la stabilité de son principal partenaire et éventuel substrat HCF, ni le facteur de transcription YY1 avec lequel il interagit. Nous avons également visualisé le profil de la PARP, comme indicateur de la voie de l'apoptose, pour vérifier une différence éventuelle de sensibilité qui pourrait exister entre les deux lignées suite au traitement.

Pour vérifier l'efficacité du traitement, nous avons suivi la stabilisation de la protéine p53 dont l'activation dénote bien une signalisation non biaisée qui se fait entre la détection des dommages et la transduction du signal. Les résultats montrent que la voie p53 n'est pas affectée par la présence de BAP1 dans ces cellules, suggérant peut être un rôle en aval ou indépendant de p53. Cependant, la voie p53 peut être affectée par l'expression de BAP1 et ce, à travers la stabilisation de la protéine Rb, déjà au niveau basal. Cette stabilisation est confirmée tout au long des temps de traitement de ces cellules par les UVC.

Cette expérience a aussi montré une induction prolongée (8h-24h) du marqueur des dommages γ H2AX dans les cellules reconstituées par le BAP1 fonctionnel (figure 24 A)

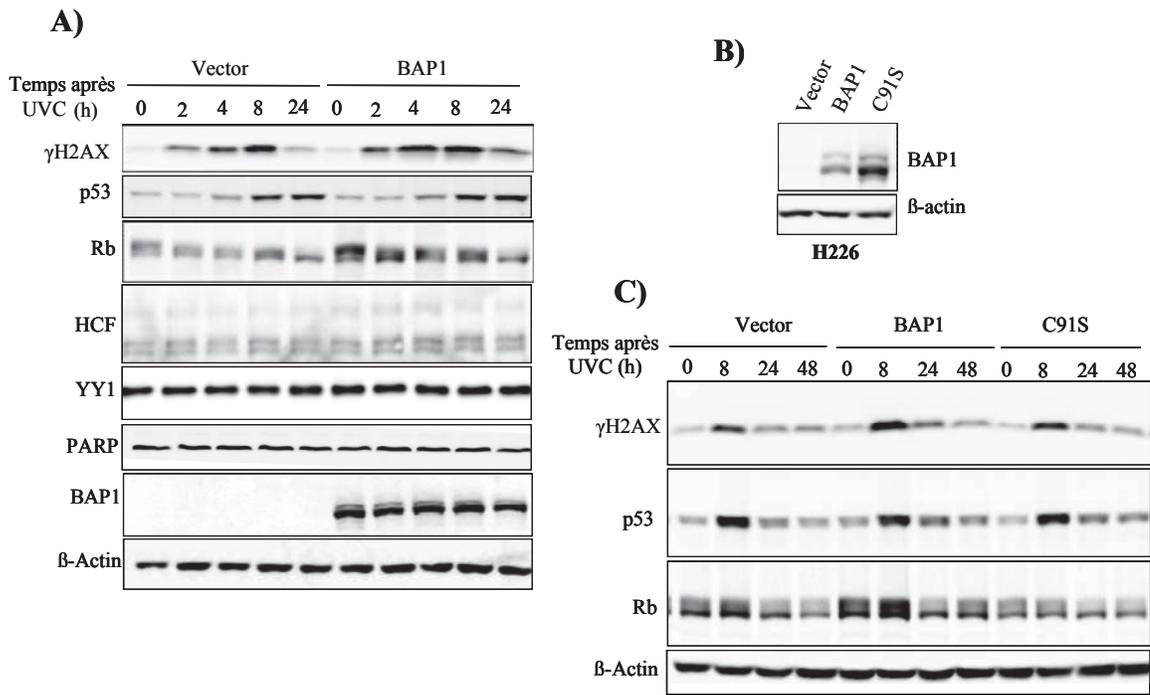


Figure 24. La reconstitution des cellules H226 BAP1^{-/-} par BAP1 sauvage et non pas par sa forme inactive induit une augmentation du niveau basal de la protéine Rb ainsi qu'une activation plus prolongée de la forme phosphorylée de la variante H2AX suite aux UVC. A) Des cellules H226 exprimant stablement un vecteur vide ou la forme sauvage de BAP1 sont traitées par les UVC à une dose de 30J/m² et collectées aux temps indiqués pour un buvardage de type Western en utilisant les anticorps indiqués. B) Des cellules H226 exprimant d'une manière stable un vecteur vide, la forme sauvage et la forme inactive de BAP1 (C91S) sont générées, et un immunobuvardage utilisant l'anticorps anti-BAP1 est réalisé pour voir leur niveau d'expression. C) Les cellules générées en B) sont traitées par les UVC à une dose de 30j/m² puis collectées aux temps indiqués pour un immunobuvardage en utilisant les anticorps indiqués.

Afin de confirmer ces observations, et mettre en évidence le rôle de BAP1 en tant que déubiquitineuse dans la stabilisation de Rb ainsi que dans l'induction prolongée de γH2AX, nous avons généré des cellules H226 stables qui expriment la protéine BAP1 inactive C91S (figure 24 B), et nous avons refait la même expérience. Alors que l'expression de BAP1 sauvage semble encore une fois augmenter le niveau d'expression basal de Rb, et prolonger l'induction de γH2AX suite aux UV, les lignées exprimant le vecteur vide et la forme inactive de BAP1 semblent présenter un niveau de Rb et un profil d'induction de γH2AX similaires. Ces résultats suggèrent donc que BAP1, grâce à son activité déubiquitineuse, est impliqué, d'une part, dans la stabilisation de la protéine Rb, un suppresseur de tumeur qui joue un rôle clé dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire, et d'autre part, dans le maintien de la forme phosphorylé de

la variante H2AX suite au traitement par les UVC. Reste à savoir si cet effet est direct ou indirect, transcriptionnel ou protéique.

3.8. L'expression de BAP1 restaure partiellement une ploïdie normale dans les cellules H226 aneuploïdes

Les résultats obtenus précédemment nous ont incités à confirmer le rôle de BAP1 dans le maintien du point de contrôle en G2/M sous l'effet des radiations ionisantes et ce, en utilisant le modèle H226. L'utilisation de ce même modèle avait aussi pour objectif de voir si les résultats, obtenus dans des conditions UVC, au niveau protéique, avaient une incidence sur la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Tout ceci impliquait donc l'analyse du profil du cycle cellulaire des lignées stables générées de H226 suite aux UVC et aux radiations ionisantes par cytométrie en flux. A notre grande surprise, les profils du cycle cellulaire des lignées, non traitées, présentent une différence dramatique dans la nature et la distribution des populations, en fonction des phases du cycle cellulaire et de la quantité d'ADN. En effet, la modélisation, par le programme ModFit de ces profils montrent que les cellules H226POZ (vecteur vide) et les cellules H229C91S (catalytiquement inactif) n'avaient aucune population diploïde à 2N, et que la totalité des populations étaient distribuées, en fonction de la quantité d'ADN, entre 4N et 8N, indiquant une population aneuploïde. En revanche, l'expression de BAP1 dans ces cellules induit l'apparition d'une population cellulaire à 2N, suggérant une restauration partielle d'une ploïdie normale dans ces cellules (figure 25 A).

Afin de mieux cerner la corrélation entre l'expression de BAP1 et l'apparition d'une population diploïde, nous avons introduit dans des cellules H226, soit un vecteur vide, soit BAP1 sauvage. Cette infection rétrovirale qui a été suivie d'un seul tri par les billes magnétique avait pour objectif d'avoir une population hétérogène où 30% seulement des cellules exprimeraient BAP1. 48 heures suivant le premier tri, un double marquage par un anticorps anti-BAP1 et l'iodure de propidium permettait de discriminer au sein de cette population hétérogène les cellules BAP1+ et les cellules BAP1-, et d'analyser le profil cellulaire de chaque population. Les résultats sont sans équivoque: alors que la lignée qui a été infectée seulement par un vecteur vide présentait une population à 4N-8N, la discrimination, par l'anticorps anti-BAP1 des populations BAP1- et BAP1+ dans les cellules partiellement infectées par BAP1 sauvage, a permis d'obtenir respectivement deux profils du cycle cellulaire distincts. Un profil 4N-8N pour la première et un profil 2N-4N-8N pour la deuxième (figure 25 B). Ces résultats suggèrent fortement que

l'expression de BAP1 dans des cellules H226 aneuploïdes diminue leur aneuploïdie et restaure partiellement une ploïdie normale. Ceci se traduit par l'apparition d'une population diploïde à 2N.

Un moyen efficace pour montrer que BAP1, en étant exprimé dans les cellules H226 qui en sont déficientes, permet de reprendre un cycle diploïde normal, serait d'identifier une population mitotique au niveau des cellules à 4N, qui serait absente chez les cellules où BAP1 n'est pas fonctionnel. Ainsi, nous avons marqué chaque lignée par un anticorps anti-phosphoH3 (Serine 10), qui marque spécifiquement les cellules entrant en mitose. L'analyse de ces populations par cytométrie en flux montre une seule population mitotique chez les lignées stables H226POZ et H226C91S, alors qu'elle montre deux populations en mitose pour les cellules H226BAP1: une au niveau de 8N et l'autre qui apparaît au niveau de 4N (figure 25 C). Afin de confirmer qu'il s'agit bien de cellules mitotiques et non d'un simple artefact d'analyse, nous avons traité ces cellules par 5 Gy de radiations ionisantes pendant deux heures. Les dommages causés par ce genre de traitement induit un arrêt quasi-instantané de la prolifération cellulaire et en l'occurrence un arrêt des cellules à la transition G2/M. Ceci se traduit donc par la disparition de cellules entrant en mitose. L'analyse par cytométrie en flux de ces populations montrent bien la disparition quasi-totale de cellules positives pour la phosphorylation au niveau de la Sérine 10 de l'Histone H3, y compris de la population mitotique au niveau 4N que nous avons observée pour les cellules H226BAP1 non traitées par les radiations ionisantes (figure 25 C).

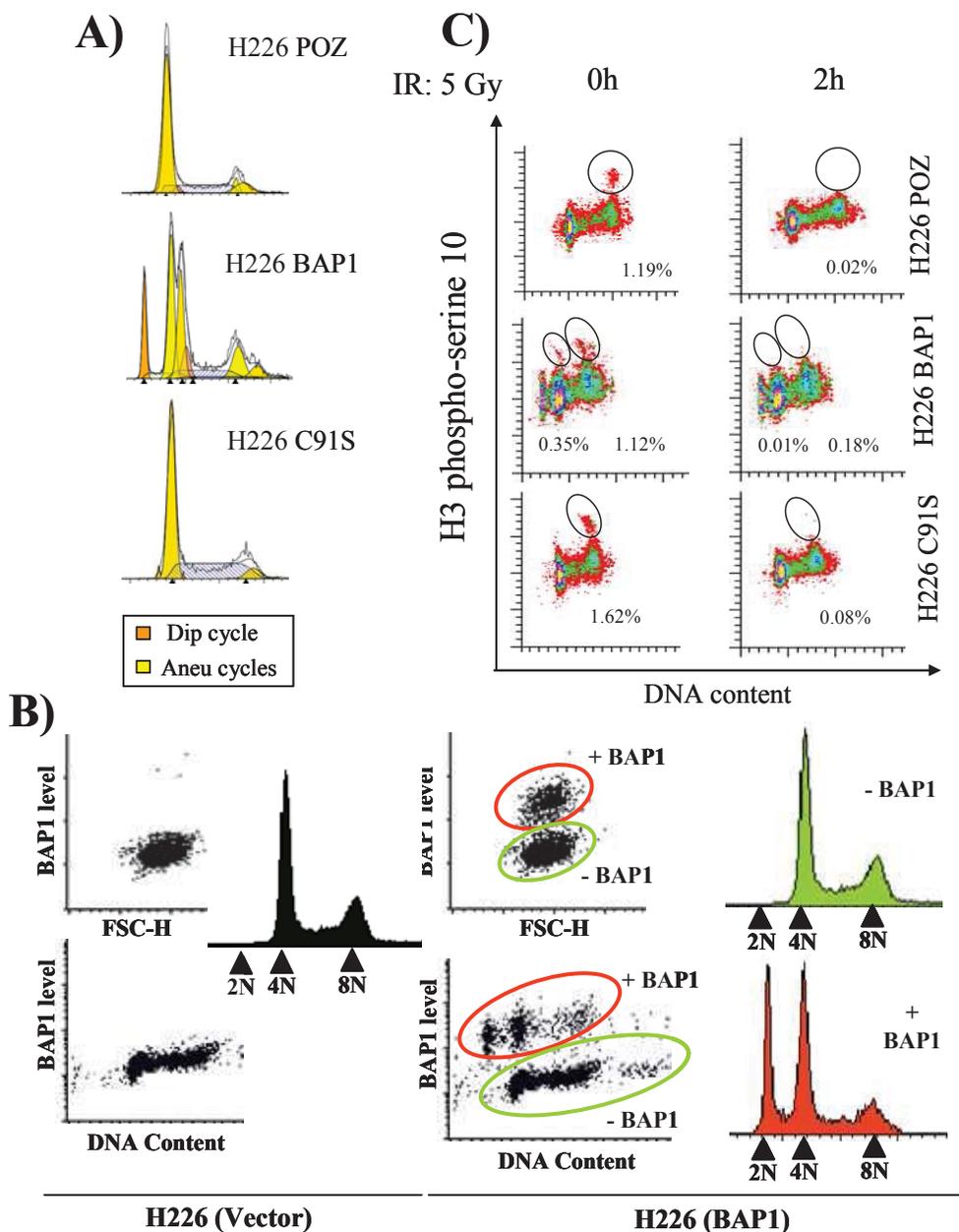


Figure 25. L'expression de BAP1 restaure partiellement une ploïdie normale dans les cellules H226 aneuploïdes. A) Le profil du cycle cellulaire des cellules H226 stablement reconstituées par un vecteur vide (H226POZ), la forme sauvage de BAP1 (H226BAP1) et la forme inactive de BAP1 (H226C91S) est analysé par cytométrie en flux. La modélisation se fait par le programme ModFit. B) Des cellules H226 exprimant un vecteur vide versus des cellules H226 qui expriment partiellement la forme sauvage de BAP1 sont doublement marquées par un anticorps anti-BAP1 et l'iodure de propidium pour mesurer la quantité d'ADN. L'analyse est faite par cytométrie en flux. Les deux populations (-BAP1 et +BAP1) sont déterminées (en vert et en rouge respectivement) pour analyser leur profil du cycle cellulaire. C) Identification des populations mitotiques chez les différentes lignées de H226. Marquage de chaque lignée par l'anticorps pSer10H3 et l'iodure de propidium. Les cellules sont traitées par les radiations ionisantes (5 Gy) pendant 2 heures pour vérifier la disparition de la population mitotique sous l'effet des dommages à l'ADN.

En conclusion, l'utilisation du modèle H226 pour étudier l'effet de BAP1 sur les points de contrôle du cycle cellulaire, induits par les dommages à l'ADN, ne nous a pas permis d'avoir des résultats fiables: la différence, qui se trouve au niveau basal, entre les différents profils du cycle cellulaire des lignées H226POZ, H226BAP1 et H226C91S, ne permet pas de visualiser et surtout de quantifier les changements de distributions des cellules en fonction des phases du cycle cellulaire, que ce soit dans des conditions normales, ou suite aux dommages à l'ADN. Bref, elle empêche une comparaison valable du fait qu'il existe un biais, déjà au niveau des cellules non traitées. Cependant, ce même biais nous a permis de réaliser une observation pertinente quant au rôle probable de BAP1 dans la ploïdie des cellules. Cette observation, qui a été validée et confirmée par les expériences décrites plus haut (figure 25), suggère fortement un rôle spécifique de la déubiquitine BAP1 dans le maintien de la stabilité génétique et la ploïdie des cellules, un processus de prévention très important contre le développement tumoral.

3.9. BAP1 est capable de corriger, d'une manière partielle, les aberrations nucléaires et l'instabilité génomique sévère des cellules H226

Les résultats obtenus précédemment ont animé en nous la volonté d'approfondir plus cette question et d'identifier les aspects qui caractérisait l'apparition de l'aneuploïdie chez les cellules déficientes en BAP1, une forme d'instabilité génomique pouvant être corrigée par l'expression de BAP1. Plus précisément, il fallait chercher la réponse au niveau du noyau de ces cellules. En effet, une simple observation des cellules H226 au microscope, suite au marquage des noyaux par le DAPI, nous permet de voir, d'une manière évidente, la présence d'une multitude d'aberrations nucléaires: micronuclei, ponts internucléaires, taille et nombre anormaux des noyaux (figure 26 A). Une instabilité génomique sévère qui représente une caractéristique très importante du cancer et qui pourrait expliquer l'état de ploïdie anormal de cette lignée cancéreuse. Afin de lier cette instabilité génomique à l'absence de BAP1 –un lien de cause à effet-, nous avons utilisé les lignées H226 générées qui expriment d'une manière stable un vecteur vide ou la protéine BAP1 sauvage (figure 26 B), dans un essai de blocage de la cytokinèse par la cytochalasine B. Cette drogue antimitotique inhibe la polymérisation des filaments d'actine et empêche ainsi la division cellulaire. Ainsi un marquage de l'ADN par le DAPI nous permet de voir mais aussi de quantifier, d'une manière

comparable, toutes les aberrations nucléaires, seulement chez les cellules mitotiques bloquées au niveau de la cytokinèse (figure 26 C).

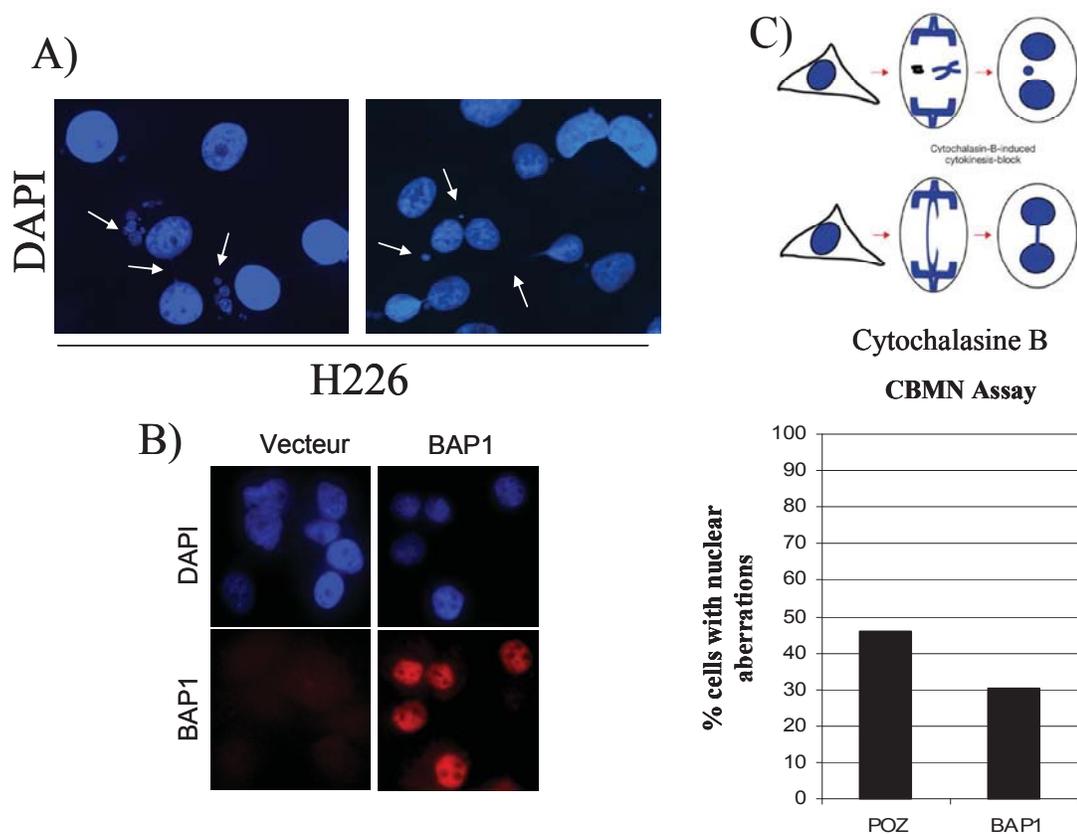


Figure 26. Les cellules H226 présentent des aberrations nucléaires et une instabilité génomique sévère pouvant être corrigés partiellement par l'expression stable de BAP1. A) Les cellules H226 sont collectées et fixées, les noyaux sont colorés par le DAPI. B) Les cellules H226 exprimant d'une manière stable un vecteur vide ou la forme sauvage de BAP1 sont marquées par la technique d'immunofluorescence. Les noyaux sont colorés par le DAPI (bleu) et BAP1 est marquée en rouge. C) Essai des micronucléi par la cytochalasine B (CBMN) (99). En haut : un schéma expliquant le principe de l'essai. En bas: Les cellules H226 exprimant stablement un vecteur vide ou la forme sauvage de BAP1 sont traitées par la cytochalasine B pendant 48 heures puis fixées. 200 cellules sont prises en compte pour visualiser les noyaux par le DAPI. Le graphe représente le pourcentage des cellules ayant des aberrations nucléaires (taille et nombre anormaux des noyaux, micronucléi, ponts internucléaires) pour chaque lignée générée. Cet essai a été réalisé une seule fois.

Quarante huit heures suite à un traitement par la cytochalasine B, les deux lignées stables de H226 sont collectées et fixées pour un marquage au DAPI (pour visualiser l'ADN) et la phalloïdine (pour voir le cytosquelette). La quantification globale de toutes les aberrations nucléaires (taille et nombre de noyaux, micronucléi, ponts internucléaires) a concerné uniquement les cellules bloquées en mitose (possédant au moins deux noyaux). Les résultats obtenus suite à cet essai montrent une diminution de 16%

par rapport au nombre de cellules présentant une partie ou toutes les aberrations nucléaires citées plus haut. Bien que cet essai n'ait été réalisé qu'une seule fois, les résultats suggèrent l'implication de BAP1 dans la régulation de la stabilité génomique, et explique par la même son rôle dans la restauration partielle de la diploïdie chez les cellules H226. Ces résultats très importants mettent au jour un aspect nouveau dans la fonction de suppression tumorale de BAP1 et ouvrent une nouvelle perspective de recherche pour élucider le ou les mécanismes qui gouvernent cette fonction.

4.DISCUSSION

La déubiquitinase BAP1 est actuellement considéré comme un suppresseur de tumeur. Cette conclusion se trouve fondée sur plusieurs observations: la première est que des réarrangements et des délétions, au niveau du locus du gène BAP1, sont notés dans plusieurs cas de cancer du sein et du poumon. Ces mutations se caractérisent notamment par une perte de l'hétérozygotie (LoH), ce qui appuie fortement un caractère hautement sélectif de ces mutations au niveau de la tumeur (51, 55). La deuxième observation est faite suite à des expériences de xénogreffes, où l'on a exprimé la protéine BAP1. Cette observation montre en effet une forte inhibition de la croissance tumorale dans ces cellules, par rapport au cas où l'on exprime un vecteur vide ou bien la protéine mutée au niveau de son site actif (26). La troisième, la plus récente, caractérise une pléiade de mutations inactivatrices dans des mélanomes "Uveal" de classes II et montre un potentiel anti-métastatique de BAP1 dans ce type de cancer (56). Partant de ces observations, il a été très important de caractériser le ou les aspects qui définissent la fonction de BAP1 en tant que suppresseur de tumeur.

Il est vrai que BAP1 a été identifiée pour la première fois en tant que protéine associée à BRCA1, un suppresseur de tumeur connu, dont la mutation se trouve impliquée dans à peu près 10% des cancers du sein. Cette interaction a été en fait mise en évidence il y a à peu près vingt ans, par le système double hybride, puis par des expériences de surexpression et de coimmunoprécipitation (51). Néanmoins, la relation entre les deux protéines reste à ce jour encore ambiguë et délicate à mettre en évidence. A part une seule étude montrant que BAP1 pouvait interférer avec l'activité ubiquitine ligase, formée par l'hétérodimère BRCA1-BARD1, aucune autre étude n'est arrivée à montrer réellement une quelconque signification biologique de cette inhibition, à reproduire cette interaction, ou même à approfondir un quelconque lien biochimique ou fonctionnel entre les deux suppresseurs de tumeur (54). En réalisant des expériences d'immunopurification de BAP1 à grande échelle, nous n'avons pas non plus réussi dans notre laboratoire à cerner cette interaction, ni dans des conditions basales, ni dans des conditions de stress génotoxique (BRCA1 étant impliqué dans la signalisation post-dommages et dans la réparation d'ADN). Ceci est en phase d'alimenter une controverse sur l'implication de BRCA1 dans la fonction de BAP1 et sur un éventuel lien entre ces deux protéines.

L'aspect le plus important qui doit être néanmoins retenu de BAP1, c'est réellement son rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique. Cette évidence est fortement

appuyée par le fait que BAP1 est majoritairement, si ce n'est totalement, complexée à la protéine HCF, un cofacteur de transcription connu pour son implication, à travers la régulation de la transcription, dans divers processus, dont le plus important est la prolifération cellulaire (57). L'autre argument qui vient soutenir cette hypothèse est que BAP1 s'incorpore dans des complexes multiprotéiques de hauts poids moléculaires formés en majorité par des facteurs et des cofacteurs de transcriptions et entre autres des enzymes qui modifient la chromatine (97). Ceci a été confirmé par une étude publiée par notre laboratoire, qui a élucidé un des mécanismes par lequel le facteur de transcription YY1 pouvait recruter, grâce à HCF, la protéine BAP1 sur certains promoteurs et que ce complexe tertiaire pouvait réguler l'expression de certains gènes (57). Le lien entre BAP1 et HCF n'étant pas nouveau, puisque les deux partenaires ont été identifiés comme régulateurs de la prolifération cellulaire et que l'implication de BAP1 dans ce processus dépendait de son interaction avec HCF (52, 53). Bien qu'une implication dans la transduction de signal puisse être plausible, l'aspect qui apparaît, d'une manière évidente, exclusivement transcriptionnel, et ce, para rapport aux publications les plus récentes sur BAP1 (56, 57), me semble extrêmement important pour façonner notre manière d'appréhender les voies dans lesquelles BAP1 pourrait être impliquée afin de remplir sa fonction de suppresseur de tumeur.

Le troisième et dernier aspect qui vient compléter les bases de l'hypothèse, sur laquelle mon projet a été construit, est la modification de BAP1, par la phosphorylation, suite aux stress génotoxique. Cet aspect a été décisif car, d'une part, nous étions peut être en train de mettre la main sur l'élément clé de la fonction suppresseur de tumeur de BAP1 et d'autre part, ceci pouvait nous permettre d'identifier un mécanisme jusque là inconnu dans la réponse aux dommages à l'ADN, un mécanisme qui lierait la détection des dommages, la transduction de signal et une régulation transcriptionnelle spécifique.

Nous avons pu confirmer la phosphorylation de BAP1 suite aux UVC et aux radiations ionisantes au niveau d'un motif SQ consensus des kinases ATM et/ou ATR. Nous avons montré que la cinétique de cette phosphorylation pouvait se prolonger jusqu'à 48 heures post traitement. Par spectrométrie de masse, nous avons également identifié de nouveaux sites de phosphorylation spécifiques aux dommages induits par les radiations ionisantes et par les UVC, dont trois d'entre eux sont aussi des motifs SQ. D'abord, l'identification des ces sites de phosphorylation seront d'une grande utilité car, l'utilisation de constructions mutantes au niveau de ces sites dans des essais

fonctionnels, nous permettront de mieux caractériser le mécanisme de régulation et d'action de cette protéine suites aux dommages.

Ensuite, il serait pertinent de mettre en évidence le rôle direct des kinases ATM et ATR dans la phosphorylation très précoce de BAP1 suite aux traitements par les agents génotoxiques. Ceci pourra se faire par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques d'ATM et ATR ainsi que par l'approche ARN interférence. L'utilisation d'un modèle cellulaire déficient en ATM et ATR nous aidera aussi à mesurer l'implication de ces deux kinases clé dans la régulation biochimique et fonctionnelle de BAP1 dans des conditions de stress génotoxique.

Au début du projet, et vu la vocation du laboratoire, portée particulièrement sur l'aspect biochimique et la caractérisation des interactions protéine-protéine, notre attention était portée sur l'impact direct de ces modifications post-dommages sur les propriétés biochimiques de BAP1: Y a-t-il un effet sur l'activité catalytique? Y a-t-il un effet sur les interactions protéine-protéine? Deux questions fondamentalement très importantes! Sachant que la fonction de suppresseur de tumeur de BAP1 dépend de son activité catalytique, déterminer si les dommages ont un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité catalytique de BAP1 est crucial pour considérer BAP1 soit comme une cible passive, inhibée dans les conditions de stress génotoxique, ou bien garder en tête que cette protéine reste active dans ces conditions et les investigations pourraient alors se poursuivre dans un sens plus que dans l'autre. A cet égard, nous avons utilisé un essai qui se base sur la réaction avec une sonde synthétique. Cette sonde permet exclusivement de voir si le site catalytique pouvait reconnaître et s'attacher à une molécule d'ubiquitine ou alors, dans des conditions de dommages, et suite notamment à sa phosphorylation, le site actif se trouve bloqué et masqué pour se lier à l'ubiquitine. Les résultats obtenus montrent bien que BAP1, du moins grâce à cet essai, pouvait encore fixer l'ubiquitine même à des temps prolongés suite aux dommages, suggérant que l'activité catalytique de BAP1 pourrait rester intacte suite aux dommages à l'ADN.

L'autre aspect, touchant à l'interaction protéine-protéine a été aussi traité au cours de mon projet. En effet, bien que ce type d'approche ne permette pas toujours de caractériser des interactions instables et transitoires, nous avons pu montrer, en réalisant des immunopurifications à grande échelle, que le profil des protéines associées à BAP1 restait intact et que les protéines prédominantes des complexes multiprotéiques dans lesquels BAP1 s'incorpore ne changeaient pas. A première vue, ceci pourrait suggérer

que BAP1, en tant qu'enzyme, mais aussi en tant que complexe transcriptionnel, n'est pas altéré par les dommages à l'ADN. Ceci impliquerait aussi que la fonction de BAP1 peu être présente et active du fait que les expériences réalisées excluent toute forme d'inhibition de cette protéine. Néanmoins, plusieurs éléments restent à confirmer. D'abord, l'activité catalytique de BAP1 suite aux dommages peut être étudiée autrement, par des essais encore plus fiables et efficaces. Nous pourrions par exemple utiliser un essai d'activité avec le substrat fluorogénique: l'AMC-ubiquitine (ubiquitin-Cterminal 7-amino-4-methylcoumarin). L'essai, durant lequel la libération de l'AMC par la déubiquitinase émet une fluorescence qui peut se mesurer à 380nm d'excitation et 460nm d'émission, peut se faire sur BAP1 purifiée dans différentes conditions de stress génotoxique.

Dans un sens plus large touchant la fonction de BAP1 en tant que régulateur de la transcription, des essais transcriptionnels *in vivo* utilisant des systèmes rapporteurs restent également à réaliser. On pourrait par exemple cotransfecter, dans des cellules en culture, des constructions de BAP1 fusionné à GAL4 avec des systèmes rapporteurs ayant le gène de la luciférase. Suite à différents traitements génotoxiques, la mesure de l'activité luciférase traduit directement l'activité transcriptionnelle de la protéine BAP1. L'utilisation de constructions mutantes de BAP1 au niveau du site actif peut servir comme contrôle négatif de l'essai.

Le volet biochimique, bien qu'il demande à être complété, comme il a été proposé plus haut, nous a incités à sauter le pas pour directement étudier, de point de vue fonctionnel et phénotypique, l'implication de BAP1 dans la réponse globale aux dommages à l'ADN. A défaut d'avoir un modèle knockout, généralement plus fiable et catégorique, mais qui demande du temps et beaucoup de ressources, l'approche la plus simple consiste à inhiber l'expression de BAP1 par la technique de l'ARN interférence et comparer, suite au traitement génotoxique, le profil du cycle cellulaire des cellules normales versus les cellules où BAP1 est inhibé. Le profil du cycle cellulaire peut être très révélateur à bien des égards: il nous permet de visualiser et de suivre l'activation ainsi que le maintien des points de contrôle. Il permet également de comparer l'apparition éventuelle ainsi que le volume des populations apoptotiques entre les deux types cellulaires (population sub-G1). Pour réaliser ce type d'approche, nous avons opté pour deux choix.

Le premier a été de générer des lignées cellulaires monoclonales qui expriment, d'une manière stable, un ARN interférent de type shRNA sans cible versus un ARN interférent dirigé contre une région de BAP1. Le deuxième était d'inhiber, d'une manière transitoire, l'expression de BAP1 et ce, en utilisant un mélange de quatre petits ARNs interférents (siRNAs), dirigés contre quatre régions distinctes de BAP1. Ainsi nous avons pu utiliser deux méthodes indépendantes et complémentaires afin d'assurer un maximum de fiabilité dans nos résultats. D'une manière consistante entre les deux types d'approche, la déplétion de BAP1 cause un défaut, non pas dans l'induction, mais dans le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M, suite aux radiations ionisantes. Un essai d'incorporation de BrdU dans ces conditions a, quant à lui, appuyé cette thèse en montrant une reprise de la prolifération cellulaire plus rapide des cellules où BAP1 est inhibé. Ces résultats suggèrent fortement que, suite aux dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes, BAP1 pourrait réguler d'une manière positive la maintenance du point de contrôle en G2/M ou bien, dit d'une autre manière, elle pourrait réguler négativement la sortie du point de contrôle et la reprise de cycle cellulaire. Afin de déterminer exactement si BAP1 agit au niveau de la transition G2/M ou au niveau du point de contrôle mitotique, nous pouvons suivre les cellules par marquage de la phosphosérine 10 de l'Histone H3 et analyser leur profil par cytométrie en flux.

D'autres expériences de surexpression ont montré qu'une construction mutante double de BAP1 inactif et incapable d'interagir avec HCF pouvait avoir un effet de dominant négatif. Cet effet se traduit par un arrêt moins prolongé des cellules en G2/M suite aux radiations. Ce résultat est important à bien des égards. Cette construction qui ne forme pas de lien avec HCF, et est inactive catalytiquement, induit un défaut similaire à celui observé dans les cellules où BAP1 est inhibé par l'ARN interférence. Ceci suggère que l'exclusion de HCF de BAP1 favorise son effet sur le point de contrôle puisque la surexpression de cette forme mutée au niveau du site actif inhibe ce même effet. Dans notre laboratoire, une purification des protéines associées à BAP1 a été réalisée spécifiquement sur la forme de BAP1 qui était incapable d'interagir avec HCF (résultats non montrés). Cette purification indique que la plupart des partenaires de BAP1, y compris HCF bien évidemment, étaient exclues du complexe à quelques exceptions. Parmi ces exceptions, la protéine ASXL2, homologue humain de Additional sex combs ASX. Cette protéine a été identifiée par quelques études comme étant un substrat potentiel de kinases ATM et/ou ATR suite aux dommages à l'ADN (93). De plus, une

étude très récente met en évidence le rôle du complexe PR-DUB dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire et spécifiquement la transition G2/M. Ce complexe formé essentiellement par la protéine Calypso (BAP1 chez l'humain) et Asx (ASXL chez l'humain) a la capacité, grâce à Calypso, de débiquitiner l'histone H2A monoubiquitinée au niveau de la lysine K119. Cette modification serait cruciale pour la régulation de la progression du cycle cellulaire. Bien que l'ubiquitination de l'histone H2A soit connue plus pour la répression transcriptionnelle, de plus en plus d'études suggèrent un rôle plus dynamique dans la régulation de l'expression génique et dans la réponse aux dommages à l'ADN, y compris la réparation des lésions génotoxiques. Grâce à des expériences de ChIP-Chip, cette étude montre que ce complexe formé principalement par Calypso-ASX est recruté sur les promoteurs de gènes tel que 14-3-3 epsilon, cyclin B et grapes (Chk1) ainsi que d'autres gènes impliqués dans la régulation du point de contrôle en G2/M et dans la réponse aux dommages à l'ADN (64).

Cette étude révèle donc que chez la drosophile, l'association entre ASX et BAP1 joue un rôle dans la régulation de l'expression génique et que cette régulation concerne, entre autres, certains gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et particulièrement le point de contrôle en G2/M. De plus, il semble que l'interaction entre BAP1 et ASXL2 chez les humains est indépendante de HCF puisque ASXL2 est stabilisée dans le complexe purifié de BAP1 (-HBM). D'un autre côté, la surexpression de la forme inactive de BAP1 et n'interagissant pas avec HCF est capable d'induire un effet dominant négatif en réponse aux radiations ionisantes. Tous ces éléments, qui s'ajoutent au fait qu'ASXL2 est aussi phosphorylée au niveau de motifs SQ suite aux dommages à l'ADN, suggèrent une association entre BAP1 et ASXL2, indépendante de HCF et conservée chez la drosophile, impliquée dans la régulation du point de contrôle en G2/M suite aux dommages à l'ADN.

La caractérisation de la réponse des cellules déplétées en BAP1 suite aux UVC montre que BAP1 n'est pas impliqué dans le point de contrôle en G1/S, le point de contrôle intra-S ainsi que l'activation du point de contrôle en G2/M. Mais cette expérience ne nous a pas permis de déduire un quelconque effet sur le maintien de l'arrêt en G2/M. Ceci est dû à une collecte des cellules allant au maximum à 48 heures post-traitement. Il est donc préconisé d'allonger beaucoup plus les temps de collecte afin d'avoir une cinétique plus complète, permettant d'analyser la reprise du cycle cellulaire, suite à la

sortie du point de contrôle en G2/M. La comparaison par cytométrie en flux des lignées H226 générées comme décrit plus haut, suite aux radiations ionisantes et aux UVC, ne nous a pas permis de déduire un quelconque effet de l'expression de BAP1 sur les points de contrôles puisqu'il y avait une différence basale entre le niveau de ploïdie de ces cellules: une autre découverte qui sera discutée plus bas. Néanmoins, le suivi, par immunobuvardage, suite aux UVC, de certaines protéines associées à BAP1 ainsi que quelques protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN a montré une diminution du niveau protéique basal de Rb ainsi qu'une induction plus prolongée de la variante phosphorylée de l'histone H2AX.

Beaucoup reste à faire afin d'élucider le mécanisme qui gouverne la fonction de BAP1 en réponse aux dommages à l'ADN, et particulièrement dans la maintenance du point de contrôle en G2/M. D'une part, montrer le rôle exact d'ASXL2 dans cette fonction, dépendamment de BAP1. Ceci peut se faire par l'utilisation de mutant de BAP1 incapable d'interagir avec ASXL2 et ce, dans des essais fonctionnels, ainsi que la déplétion d'ASXL2 par l'ARN interférence, afin d'étudier son effet sur le point de contrôle en G2/M suite aux radiations ionisantes et aux UVC. D'autre part, il sera pertinent de chercher les cibles transcriptionnelles et protéiques de BAP1 dans des conditions de stress génotoxique. On pourra alors suivre par immunobuvardage le niveau protéique des certaines protéines clés comme γ H2AX, Chk1, Chk2, p53, Rb, Cyclin B, 14-3-3, CDC25. Le niveau d'expression de ces protéines peut être vérifié aussi par RT-PCR afin de vérifier l'effet transcriptionnel de BAP1 sur ces protéines.

Plusieurs éléments soutiennent une implication directe de BAP1 dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes clés impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire, la réparation d'ADN et la mitose. Le premier élément concerne une expérience, réalisée dans notre laboratoire (57), de puces à ADN utilisées dans des conditions normales versus la déplétion de BAP1 par deux ARN interférents différents. Les résultats montrent la diminution du niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réplication et la réparation d'ADN (Tableau IV)

Table IV. Les gènes dérégulés par la déplétion de BAP1 sont impliqués dans des processus qui participent à la régulation de la réponse des cellules aux dommages à l'ADN (57).

Gene function and name ^a	Gene designation	shBAP1 #1		shBAP1 #2	
		Fold change ^b	<i>p</i>	Fold change ^b	<i>p</i>
Cell cycle					
Cyclin E2	CCNE2	0.18	5.15E-07	0.18	6.05E-06
CDC5 cell division cycle 5-like (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	CDC5L	0.30	1.23E-06	0.65	1.02E-05
S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	SKP2	0.39	2.07E-05	0.28	1.84E-05
Cell division cycle 2	CDC2	0.39	1.38E-05	0.33	3.55E-05
Cell division cycle 25A	CDC25A	0.42	2.41E-04	0.40	1.85E-07
Retinoblastoma-like 1 (p107)	p107	0.44	2.11E-05	0.53	6.88E-04
E2F transcription factor 5	E2F5	2.10	9.17E-05	4.00	3.74E-07
Cyclin D2	CCND2	2.32	8.10E-07	3.01	6.18E-08
DNA replication					
Replication factor C (activator 1) 3	RFC3	0.42	7.01E-06	0.29	5.79E-05
CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	CDC6	0.46	1.58E-05	0.34	5.78E-06
CDC45 cell division cycle 45-like (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC45L	0.47	1.91E-04	0.31	6.95E-05
Geminin	GMNN	0.48	2.41E-05	0.56	1.97E-05
DNA repair					
CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)	CHEK1	0.38	9.19E-07	0.51	5.31E-07
RAD51-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	RAD51L1	0.44	2.24E-04	0.47	5.41E-06
Ubiquitin-specific peptidase 1	USP1	0.48	1.06E-05	0.40	3.67E-05
Breast cancer 1, early onset	BRCA1	0.48	5.43E-05	0.44	2.19E-04
BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1	BRIP1	0.49	1.19E-04	0.37	5.13E-05
BRCA1-associated protein 1	BAP1	0.33	4.59E-05	0.33	7.46E-07

^a Genes are selected as representative examples of different cellular functions.

^b Values are shBAP1/shControl ratios.

La dérégulation de plusieurs d'entre ces gènes a été confirmée par des RT-PCR et la diminution significative de la protéine Chk1 dans ces micrpuces ADN a été confirmée, au niveau protéique, par immunobuvardage en utilisant les deux ARN interférents (figure 27).

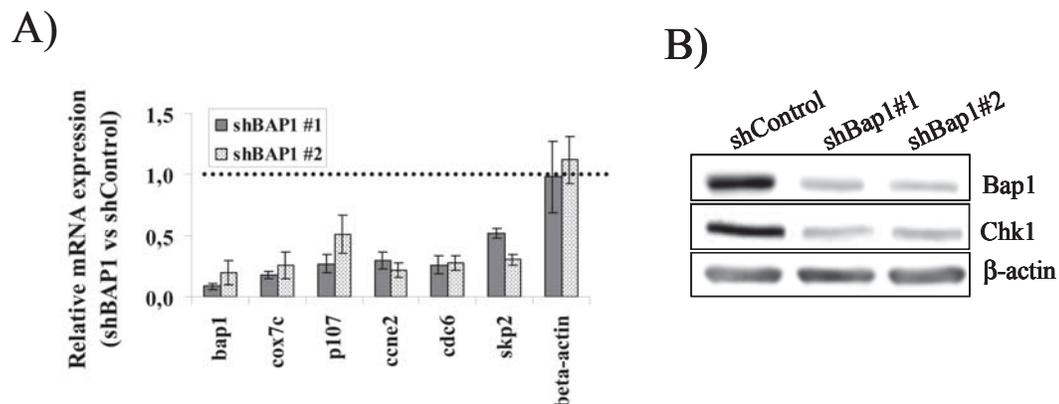


Figure 27. BAP1 régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. A) Analyse par PCR en temps réel des gènes indiqués (57). B) L'expression de Chk1 après la déplétion de BAP1 par deux constructions différentes de shRNA.

La protéine Chk1 est une protéine intéressante pour plusieurs raisons. La première est que nous la trouvons dérégulée au niveau transcriptionnel et protéique dans des cellules déplétées en BAP1. La deuxième est que chez la drosophile, le complexe PR-DUB

formé essentiellement par Calypso-ASX (BAP1-ASXL2) est recruté sur le promoteur de *grapes* (Chk1); ceci a été montré par ChIP-chip. La troisième raison est que Chk1 est une protéine clé impliquée dans la transduction du signal en réponse aux UVC et aux radiations ionisantes. En effet, cette kinase est le substrat direct d'ATR et elle est impliquée dans l'activation de l'arrêt du cycle cellulaire suite aux dommages à l'ADN. La voie ATR-Chk1 peut agir d'une manière indépendante ou en collaboration avec la voie ATM-Chk2. Il a été montré, dans plusieurs études que, suite aux radiations ionisantes, la voie ATM-Chk2 était responsable de l'induction immédiate du point de contrôle mais que la voie ATR-Chk1 était requise pour le maintien de cet arrêt. Cet arrêt étant nécessaire pour la réparation des lésions (98).

Il serait donc important d'étudier la relation qui lie BAP1 à Chk1 suite aux dommages à l'ADN. Par des expériences d'immunoprécipitation à la chromatine ChIP, on pourrait étudier la cinétique de recrutement de BAP1 sur le promoteur de Chk1 et quantifier par RT-PCR, le niveau de son expression en fonction de cette cinétique. Dans un sens plus global, nous pouvons envisager des expériences de ChIP-chip dans des conditions de stress génotoxique afin de voir le recrutement différentiel de BAP1 dans des conditions normales de prolifération versus des conditions de dommages. Ceci nous permettra d'identifier toutes les cibles transcriptionnelles directes de BAP1 et nous permettra de voir par la suite si BAP1 participe à leur activation ou leur inhibition suite aux dommages à l'ADN.

Notre vision devient de plus en plus claire quant à l'implication de BAP1 dans la réponse aux dommages à l'ADN, et les résultats que nous avons obtenus, combinés à plusieurs éléments recueillis de plusieurs autres études, nous permettent d'élaborer des hypothèses de plus en plus complètes.

Un autre résultat, qui vient mettre plus de lumière sur BAP1, est l'instabilité génomique sévère par laquelle se caractérisent les cellules H226. Ces cellules, issues d'un mésothéliome, présentent une déficience en BAP1, causée par une troncation du gène, la rendant ainsi non fonctionnelle. Cette instabilité se traduit aussi au niveau de l'hétérogénéité de cette population cellulaire constituée en grande partie de cellules tétraploïdes et aneuploïdes. Aussi surprenant que cela puisse être, l'expression dans ces cellules d'un BAP1 fonctionnel et catalytiquement actif restaure partiellement une ploïdie normale et pourrait aussi enrichir cette population en cellules présentant moins

d'aberrations nucléaires. Ceci suggère fortement que BAP1 est impliqué dans la stabilité génomique des cellules, un état qui les prévient de devenir cancéreuses.

Alors, peut-on lier le maintien du point de contrôle en G2/M et la stabilité génomique? Deux aspects dans lesquels BAP1 est probablement impliquée et deux mécanismes de protection anti-tumorale.

La stabilité génomique dans la cellule est le fruit de plusieurs voies de signalisations. Le point de contrôle en G2/M en est l'une des plus importantes. En effet, une cellule qui entame la mitose avec un ADN endommagé, risque très fortement de donner naissance à deux cellules filles portant dans leur génome ces lésions. Allant des mutations ponctuelles aux cassures double brins, les dommages doivent être réparés avant la division cellulaire afin de prévenir l'instabilité génomique.

Partant de cette logique, BAP1 serait un des gardiens du génome qui, agissant au niveau du maintien du point de contrôle en G2/M suite aux dommages à l'ADN, permet à la cellule de réparer les dommages qu'elle a subi pour pouvoir franchir la transition G2/M en sécurité. Etant un acteur de la régulation transcriptionnelle, BAP1 peut aussi, à cet égard, moduler la transcription de gènes impliqués directement dans la réparation d'ADN. En plus des analyses transcriptionnelles citées plus haut, nous envisageons de réaliser des essais de réparation afin de vérifier l'impact de la déplétion de BAP1 sur la réparation des photoproduits causés par les UVC, et les cassures double brins causées par les radiations ionisantes. Ainsi, le lien direct entre point de contrôle, réparation d'ADN et stabilité génomique pourra être mieux étudié à la lumière de ce qui a été découvert sur le rôle de BAP1 dans la réponse globale aux dommages à l'ADN: une réponse à vocation transcriptionnelle.

5. CONCLUSIONS

BAP1 est un suppresseur de tumeur, sélectivement muté dans certains cancers du poumon et du sein, et dont l'expression inhibe la croissance tumorale. De part son potentiel anti-métastatique, BAP1 est aussi muté d'une manière sélective et abondante dans des mélanomes "Uveal" de classe II.

Comment fonctionne cette protéine pour prévenir le développement tumoral et métastatique, et quels sont les mécanismes et les aspects qui gouvernent sa fonction?

Plusieurs études ont tenté de répondre à ces questions, chacun son approche, chacun son expertise.

Certains ont voulu confirmer une interaction entre BAP1 et BRCA1, sans que cela ne débouche sur une conclusion définitive démontrant un lien fonctionnel entre ces deux protéines (51, 54). D'autres se sont concentrés plus sur le substrat direct que BAP1 pourrait déubiquitiner. Dans ce sens, HCF est un candidat probable puisque BAP1 peut déubiquitiner HCF ubiquitiné par des chaînes K48 (53). Chez la drosophile, BAP1 peut, dans le cadre du complexe PR-DUB, déubiquitiner l'histone H2A monoubiquitinée, régulant ainsi l'expression de plusieurs gènes, en l'occurrence les gènes *hox* (64). Ces résultats, ainsi que leur incidence biologique et fonctionnelle, restent à confirmer chez l'humain.

Tous ces résultats complètent la découverte majeure qui a été publiée récemment par notre laboratoire, et qui fait la lumière sur un des mécanismes majeurs qui supportent la fonction de BAP1. Cette étude montre en effet que BAP1 s'incorpore dans des complexes multiprotéiques de hauts poids moléculaires, qui sont constitués majoritairement de facteurs et de cofacteurs de transcription. En plus, cette étude caractérise un système par lequel, le facteur de transcription YY1 recrute BAP1, à travers son interaction avec HCF, sur les promoteurs des gènes cibles et que ce complexe tertiaire régule l'expression de ces gènes. Mais du fait de la variété des facteurs de transcriptions associés à BAP1, incluant entre autre MNF, NRF1, FOXK1 et FOXK2, le couple HCF-BAP1 s'avère être un associé "JOCKER" pouvant influencer transcriptionnellement plusieurs processus cellulaires. Un de ces processus est la prolifération cellulaire puisqu'il a été montré que ce processus impliquait l'interaction de HCF avec BAP1.

Mon projet de maîtrise fait partie de ces approches qui tentent de lever le voile sur la fonction de BAP1. Une fonction qui porte, semble-t-il, plusieurs facettes.

BAP1 semble être réceptif à des signaux de stress génotoxiques qui peuvent être émis suite à la détection de dommages à l'ADN. De plus, une analyse globale de puces à ADN montre bien que la déplétion de BAP1 induit une dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans les points de contrôle induits par les dommages, ainsi que des gènes de réparation d'ADN et d'apoptose. Ceci nous a incités à considérer un rôle de BAP1 dans la réponse des cellules aux dommages à l'ADN, et à considérer que ce rôle était une autre facette de BAP1 en tant que suppresseur de tumeur. Ainsi les résultats obtenus durant la réalisation de mon projet ont permis d'avancer de plusieurs pas dans la caractérisation de cette fonction. D'abord, nous avons montré que BAP1 est hyperphosphorylé suite aux dommages à l'ADN, en identifiant notamment plusieurs sites de phosphorylations post-dommages. Certains d'entre ces sites sont des motifs SQ, des substrats probables des kinases ATM et/ou ATR. Nous avons également montré que les dommages n'affectaient pas les composants protéiques majeurs qui s'associent à BAP1. Toujours sur le plan biochimique, les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les dommages n'altèrent pas la disponibilité du site actif de BAP1 et sa capacité à fixer l'ubiquitine. Ces résultats suggèrent donc que BAP1 reste fonctionnel et que les modifications post-dommages ne lui sont pas inhibitrices. Au niveau fonctionnel, et confirmant un rôle plutôt actif, nous avons pu mettre en évidence l'implication de BAP1 dans la maintenance du point de contrôle en G2/M suite aux radiations ionisantes. Cette implication étant dépendante de son activité catalytique et possiblement de son interaction avec ASXL2 et non pas HCF. Ceci est conforté par une étude chez la drosophile qui met en évidence le recrutement du couple BAP1-ASX sur le promoteur de gènes impliqués dans la transition G2/M et la réparation d'ADN. Une découverte qui indique un rôle plutôt conservé de BAP1-ASXL2 dans la réponse aux dommages à l'ADN. Beaucoup reste à faire afin de caractériser cette association en profondeur. On pourrait alors imaginer que BAP1 est incorporé dans deux complexes majeurs: l'un qui implique la protéine HCF et l'autre impliquant ASXL2. Cette dualité crée une diversité de réponses biologiques, dépendamment de comment ces deux complexes sont recrutés d'une manière différentielle par les facteurs de transcription.

L'autre découverte majeure de ce projet, est que l'expression d'un BAP1 actif était capable de restaurer une ploïdie normale et de corriger des aberrations nucléaires observées chez des cellules tumorales ou le gène de BAP1 présente une troncation le rendant non fonctionnel. Des résultats qui suggèrent un rôle de BAP1 dans la stabilité

génomique, un état qui prévient l'apparition et le développement du cancer. Un résultat qui peut aussi lier la stabilité génomique à la maintenance du point de contrôle, à travers la réparation d'ADN: trois aspects primordiaux de la suppression tumorale. Trois aspects sur lesquels il faudra investiguer plus en profondeur afin de comprendre exactement pourquoi certaines tumeurs ont besoins d'éliminer génétiquement BAP1 pour pouvoir se développer et évoluer. Cette compréhension permettra la conception d'approches thérapeutiques plus ciblées et donc plus efficaces.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11(3):141-8. 95.
2. Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(21):4776-89.
3. Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 2004;379(Pt 3):513-25.
4. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004;4(5):349-60.
5. Staub O, Rotin D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* 2006;86(2):669-707.
6. Hicke L, Schubert HL, Hill CP. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Aug;6(8):610-21.
7. Dikic I, Crosetto N, Calatroni S, Bernasconi P. Targeting ubiquitin in cancers. *Eur J Cancer* 2006;42(18):3095-102.
8. Andermarcher E, Bossis G, Farras R, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. La dégradation protéasomique. De l'adressage des protéines aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Médecine/Sciences* 2005; 21(2):141-9.
9. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(3):169-78.
10. Farras R, Bossis G, Andermarcher E, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(1):31-51.
11. Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Médecine/Sciences* 2000;16(5):6239.

12. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Sep;9(9):679-90.
13. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):55-72.
14. McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):736-41.
15. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82(2):373-428.
16. Ciechanover A, Ben-Saadon R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 2004; 14(3):103-6.
17. McBride WH, Iwamoto KS, Syljuasen R, Pervan M, Pajonk F. The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene* 2003; 22(37):5755-73.
18. Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266(3):633-40.
19. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000; 22(5):442-51.
20. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 29;1695(1-3):189-207.
21. Ambroggio, X.I., Rees, D.C., and Deshaies, R.J. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol*. 2, e2. 10.1371/journal.pbio.0020002.
22. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 2005 Dec 2; 123(5):773-86.

23. Johnston SC, Larsen CN, Cook WJ, Wilkinson KD, Hill CP. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J* 1997; 16: 3787–96.
24. Zhang N, Wilkinson K, Bownes M. Cloning and analysis of expression of a ubiquitin carboxyl terminal hydrolase expressed during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1993;157:214–23
25. Koulich E, Li X, DeMartino GN. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 1072–82.
26. Ventii KH, Devi NS, Friedrich KL, Chernova TA, Tighiouart M, et al. BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res* 2008; 68 : 6953 – 62.
27. Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:50–2.
28. Borodovsky A, Ovaa H, Kolli N, Gan-Erdene T, Wilkinson KD, et al. Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chem Biol* 2002;9: 1149– 59.
29. Messick TE, Russell NS, Iwata AJ, Sarachan KL, Shiekhattar R, et al. Structural basis for ubiquitin recognition by the Otu1 ovarian tumor domain protein. *J Biol Chem* 2008; 283: 11038–49
30. Nicastro G, Menon RP, Masino L, Knowles PP, McDonald NQ, Pastore A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:10493–8.

31. Winborn BJ, Travis SM, Todi SV, Scaglione KM, Xu P, et al. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem* 2008;283: 26436–43.
32. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; 298:611–5.
33. McCullough J, Clague MJ, Urbe S. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol* 2004; 166:487–92.
34. Zhu P, Zhou W, Wang J, Puc J, Ohgi KA, et al. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol Cell* 2007; 27: 609–21.
35. Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 2002; 419:403–7.
36. Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, et al. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science* 2002; 298: 608–11.
37. Sato Y, Yoshikawa A, Yamagata A, Mimura H, Yamashita M, et al. Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 2008; 455: 358–62.
38. Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science* 298, 608–611.
39. Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611–615.

40. Borodovsky, A., Kessler, B.M., Casagrande, R., Overkleeft, H.S., Wilkinson, K.D., and Ploegh, H.L. (2001) . A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J.* 20, 5187–5196.
41. Van der Knaap, J.A., Kumar, B.R., Moshkin, Y.M., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck, A.J., Karch, F., and Verrijzer, C.P. (2005). GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol. Cell* 17, 695–707.
42. Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E., and Sun, S.C. (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I κ B kinase γ -dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3886–3895.
43. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78:363-97.
44. Patrick J. Biggs, Richard Wooster, Deborah Ford, Pam Chapman, Jonathon Mangion, Yvette Quirk, Douglas F. Easton, John Burn & Michael R. Stratton. (1995). Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12–q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene *Nature Genetics* 11, 441 – 443
45. Cummins, J. M. and Vogelstein, B. (2004) HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* 3, 689–692
46. Li, M., Brooks, C. L., Kon, N. and Gu, W. (2004) A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol. Cell* 13, 879–886

47. Meulmeester, E., Pereg, Y., Shiloh, Y. and Jochemsen, A. G. (2005) ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle* 4, 1166–1170
48. Pereg Y, Liu BY, O'Rourke KM, Sagolla M, Dey A, Komuves L, French DM, Dixit VM. Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat Cell Biol.* 2010 Apr; 12(4):400-6. Epub 2010 Mar 14.
49. Nikita Popov, Michael Wanzel, Mandy Madiredjo, Dong Zhang, Roderick Beijersbergen, Rene Bernards, Roland Moll, Stephen J. Elledge and Martin Eilers (2007) The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nature Cell Biology*, volume 9, number 7.
50. Johnston, S. C., C. N. Larsen, W. J. Cook, K. D. Wilkinson, and C. P. Hill. 1997. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* 16:3787–3796.
51. Jensen, D. E., M. Proctor, S. T. Marquis, H. P. Gardner, S. I. Ha, L. A. Chodosh, A. M. Ishov, N. Tommerup, H. Vissing, Y. Sekido, J. Minna, A. Borodovsky, D. C. Schultz, K. D. Wilkinson, G. G. Maul, N. Barlev, S. L. Berger, G. C. Prendergast, and F. J. Rauscher III. 1998. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 16:1097–1112.
52. Machida, Y. J., Y. Machida, A. A. Vashisht, J. A. Wohlschlegel, and A. Dutta. 2009. The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. *J. Biol. Chem.* 284:34179–34188.
53. Misaghi, S., S. Ottosen, A. Izrael-Tomasevic, D. Arnott, M. Lamkanfi, J. Lee, J. Liu, K. O'Rourke, V. M. Dixit, and A. C. Wilson. 2009. Association of C-

terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 29:2181–2192

54. Nishikawa, H., W. Wu, A. Koike, R. Kojima, H. Gomi, M. Fukuda, and T. Ohta. 2009. BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res.* 69:111–119.
55. Wood, L. D., D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjoblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyanksky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P. A. Wilson, J. S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J. K. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, B. H. Park, C. L. Pethiyagoda, P. V. Pant, D. G. Ballinger, A. B. Sparks, J. Hartigan, D. R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos, P. Buckhaults, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and B. Vogelstein. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318:1108–1113.
56. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matatall KA, Helms C, Bowcock AM. Frequent Mutation of BAP1 in Metastasizing Uveal Melanomas. *Science*. 2010 Nov 4.
57. Yu H, Mashtalir N, Daou S, Hammond-Martel I, Ross J, Sui G, Hart GW, Rauscher FJ 3rd, Drobetsky E, Milot E, Shi Y, Affar el B. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol.* 2010 Nov; 30(21):5071-85. Epub 2010 Aug 30.
58. Wysocka, J., M. P. Myers, C. D. Laherty, R. N. Eisenman, and W. Herr. 2003. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3–K4

methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev.* 17:896–911.

59. Goto, H., S. Motomura, A. C. Wilson, R. N. Freiman, Y. Nakabeppu, K. Fukushima, M. Fujishima, W. Herr, and T. Nishimoto. 1997. A single-point mutation in HCF causes temperature-sensitive cell-cycle arrest and disrupts VP16 function. *Genes Dev.* 11:726–737.
60. Julien, E., and W. Herr. 2003. Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J.* 22:2360–2369.
61. Luciano, R. L., and A. C. Wilson. 2003. HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *J. Biol. Chem.* 278:51116–51124.
62. Gordon, S., G. Akopyan, H. Garban, and B. Bonavida. 2006. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25:1125–1142.
63. Shi, Y., J. S. Lee, and K. M. Galvin. 1997. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1332:F49–F66.
64. Scheuermann, J. C., A. G. de Ayala Alonso, K. Oktaba, N. Ly-Hartig, R. K. McGinty, S. Fraterman, M. Wilm, T. W. Muir, and J. Muller. 2010. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465:243–247.
65. Dedon PC, Salzberg AA, Xu J. Exclusive production of bistranded DNA damage by calicheamicin. *Biochemistry.* 1993 Apr 13; 32(14):3617-22.
66. de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell.* 2001 Nov; 8(5):1129-35.

67. Shiomi Y, Shinozaki A, Nakada D, Sugimoto K, Usukura J, Obuse C, Tsurimoto T. Clamp and clamp loader structures of the human checkpoint protein complexes, Rad9-1-1 and Rad17-RFC. *Genes Cells*. 2002 Aug;7(8):861-8.
68. Bermudez VP, Maniwa Y, Tappin I, Ozato K, Yokomori K, Hurwitz J. The alternative Ctf18-Dcc1-Ctf8-replication factor C complex required for sister chromatid cohesion loads proliferating cell nuclear antigen onto DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2; 100(18):10237-42. Epub 2003 Aug 20.
69. Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 2006 Jan; 21(1):3-9. Epub 2005 Nov 28.
70. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 2003 Jun 6; 300(5625):1542-8.
71. Lavin, M. F. (2007). "ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks." *Oncogene* 26(56): 7749-58.
72. Lee, J. H. and Paull, T. T. (2007). "Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks." *Oncogene* 26(56): 7741-8.
73. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D. J. (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." *J Biol Chem* 276(45): 42462-7.
74. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W. M. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* 146(5): 905-16.
75. Anderson, L., Henderson, C. and Adachi, Y. (2001). "Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage." *Mol Cell Biol* 21(5): 1719-29.

76. Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J. and Jackson, S. P. (2005). "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks." *Cell* 123(7): 1213-26.
77. Ward, I. M. and Chen, J. (2001). "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress." *J Biol Chem* 276(51): 47759-62.
78. Ahn, J. Y., Schwarz, J. K., Piwnica-Worms, H. and Canman, C. E. (2000). "Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation." *Cancer Res* 60(21): 5934-6.
79. Melchionna, R., Chen, X. B., Blasina, A. and McGowan, C. H. (2000). "Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1." *Nat Cell Biol* 2(10): 762-5.
80. Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M. B., Katzir, E. and Oren, M. (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." *Genes Dev* 15(9): 1067-77
81. Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J. and Mak, T. W. (2000). "DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2." *Science* 287(5459): 1824-7.
82. Dumaz, N. and Meek, D. W. (1999). "Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2." *Embo J* 18(24): 7002-10.
83. Sorensen, C. S., Syljuasen, R. G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K. K., Zhou, B. B., Bartek, J. and Lukas, J. (2003). "Chk1 regulates the

- S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A." *Cancer Cell* 3(3): 247-58.
84. Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S. and Piwnica-Worms, H. (1997). "Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216." *Science* 277(5331): 1501-5.
85. Zhao, H. and Piwnica-Worms, H. (2001). "ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1." *Mol Cell Biol* 21(13): 4129-39.
86. Costa RH. FoxM1 dances with mitosis. *Nat Cell Biol.* 2005 Feb; 7(2):108-10.
87. Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J. and Jasin, M. (1998). "Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 5172-7.
88. Peterson, C. L. and Cote, J. (2004). "Cellular machineries for chromosomal DNA repair." *Genes Dev* 18(6): 602-16.
89. Weterings, E. and Chen, D. J. (2008). "The endless tale of non-homologous end joining." *Cell Res* 18(1): 114-24.
90. Willis, S. N. and Adams, J. M. (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 617-25.
91. Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem.* 1999 Dec 31; 274(53):37538-43.
92. Stokes MP, Rush J, Macneill J, Ren JM, Sprott K, Nardone J, Yang V, Beausoleil SA, Gygi SP, Livingstone M, Zhang H, Polakiewicz RD, Comb

- MJ. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 11; 104(50):1985560.
93. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160-6.
94. Nakatani, Y., and V. Ogryzko. 2003. Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol*. 370:430–444.
95. Tyagi, S., A. L. Chabes, J. Wysocka, and W. Herr. 2007. E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol. Cell* 27:107–119.
96. Affar, E. B., F. Gay, Y. Shi, H. Liu, M. Huarte, S. Wu, C. Tucker, E. Li, and Y. Shi. 2006. Essential dosage-dependent functions of the transcription factor Yin Yang 1 in late embryonic development and cell cycle progression. *Mol. Cell Biol*. 26:3565–3581
97. Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*. 2009 Jul 23; 138(2):389-403.
98. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May; 3(5):421-9.
99. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000 Nov 20; 455(1-2):81-95.