

Université de Montréal

# Étude de l'activité des présumés IRES de l'ARN messenger de p53

par

Alexandra Elena Cadar

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en Biochimie

**Juin 2014**

© Alexandra Elena Cadar, 2014



**Université de Montréal**  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'activité des présumés IRES de l'ARN messenger de p53

**présenté par**  
**Alexandra Elena Cadar**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luc DesGroseillers, président-rapporteur  
Gerardo Ferbeyre, directeur de recherche  
Léa Brakier-Gingras, co-directrice  
Stephen Michnick, membre du jury



## Résumé

Le facteur de transcription p53 joue un rôle crucial dans la suppression de tumeurs et dans la sénescence cellulaire. Selon la littérature, l'ARN messager de p53 contient deux sites d'entrée interne des ribosomes (IRES), un dans la région 5' non-traduite et l'autre au début de la région codante. L'utilisation de ces IRES devrait activer la synthèse de p53 en conditions de stress, comme dans la sénescence. Notre but était d'identifier les éléments-clés qui contrôlent l'activité des IRES de p53 et d'étudier leur comportement dans la sénescence. Nous avons construit des vecteurs bicistroniques à deux luciférases contenant le gène de la *Renilla* (Rluc), traduit via le mécanisme classique coiffe-dépendant, une région intercistronique, contenant une des séquences IRES de p53, et le gène de la luciole (Fluc), dont la traduction dépend de cet IRES. L'activité IRES a été évaluée par le rapport des activités Fluc/Rluc dans des extraits cellulaires de HEK293T et de fibroblastes primaires humains. Nous avons inséré une structure précédant l'IRES évitant qu'une translecture ou une réinitiation de la traduction puisse conduire à la synthèse de Fluc. Nous avons vérifié l'absence de promoteur cryptique dans les IRES et nous avons construit des vecteurs contenant la séquence complémentaire inversée (SERI) des IRES. Nous avons observé que l'efficacité de traduction via les IRES de p53 ou les séquences SERI est semblable. De plus, la traduction de Fluc via les présumés IRES de p53 ne représente qu'environ 1% de la traduction de Fluc via une initiation coiffe-dépendante. L'activité des prétendus IRES ne semble pas augmenter en conditions de sénescence. Enfin, nous avons introduit une région structurée dans la région 5'UTR du messenger bicistronique. Cette structure a bloqué la traduction coiffe-dépendante mais aussi la traduction IRES-dépendante. L'ensemble de nos résultats nous conduit à affirmer que l'ARN messager de p53 ne contient pas d'IRES et nous suggérons que la faible activité Fluc observée résulterait d'un épissage cryptique conduisant à l'apparition d'un messenger dont la traduction génère une portion de Rluc fusionnée à Fluc. Nos résultats sont en accord avec des données rapportées dans la littérature démontrant que l'existence de la plupart des IRES cellulaires est contestée. Un ensemble de contrôles rigoureux doit être appliqué à l'étude de tout IRES présumé avant d'affirmer son existence. Le système à deux luciférases, considéré comme le modèle de choix pour l'étude des IRES, peut en fait révéler diverses anomalies de l'expression des gènes.

**Mots clés :** p53, traduction IRES-dépendante, sénescence, vieillissement

## Abstract

p53 is a transcription factor that plays a crucial role in tumor suppression and cellular senescence. According to the literature, the p53 mRNA contains two internal ribosome entry sites (IRES), one in the 5' untranslated region and the other one at the beginning of the coding region. The two IRES should enable the synthesis of p53 to occur under stress conditions, such as senescence. The aim of our study was to identify the key elements that control the activity of the two p53 IRES and to study their behavior in senescence. We constructed two dicistronic vectors containing the Renilla luciferase gene (Rluc), which is translated in a classical cap-dependent manner, an intercistronic region containing one of the two IRESs sequences of p53, and the firefly luciferase gene (Fluc), whose translation depends on the IRES in the intercistronic region. The IRES activity was assessed by the ratio between the two luciferase activities (Fluc/Rluc) in cell extracts from HEK293T and primary human fibroblasts. We also inserted a structure preceding the IRES sequence that prevented readthrough or translation reinitiation, which could lead to Fluc synthesis. We verified the absence of cryptic promoter in the two IRES sequences. We also constructed vectors containing the reverse complement region of each of the two p53 IRES (called SERI). We found that the efficiency of translation of Fluc via IRES sequences or via SERI sequences is similar. In addition, the level of Fluc translated via the presumed p53 IRES represents only 1% of the level of Fluc translated in a cap-dependent manner. The activities of so-called IRES of the p53 messenger do not increase in senescent human fibroblasts. Finally, the introduction of a structured region in the 5'UTR of the dicistronic messenger repressed not only the cap-dependent translation of Rluc but also the IRES-dependent translation of Fluc. Our results lead us to conclude that the p53 messenger does not contain any IRES and suggest that the low Fluc activity observed results from a cryptic splicing producing a messenger whose translation generates a portion of Rluc fused to Fluc. Our results are consistent with data reported in the literature showing that the existence of most cellular IRES is disputed. A set of stringent controls must be applied to the study of any presumed IRES before asserting its existence. The two-luciferase reporter, considered as the model of choice for studying IRES-translation, can in fact reveal various abnormalities of gene expression.

**Keywords :** p53, IRES-dependent initiation, senescence, aging



# Table des matières

|   |    |
|---|----|
| Liste des figures .....   | ix |
| Liste des abréviations .....  | x  |
| Chapitre I : Introduction.....  | 1  |
| 1.1 La problématique .....  | 1  |
| 1.2 P53, le « gardien du génome ».....  | 1  |
| 1.3 Une balance fine entre la suppression de tumeurs et la longévité .....                | 2  |
| 1.4 Vieillesse et sénescence.....   | 3  |
| 1.4.1 Marqueurs de la sénescence .....  | 3  |
| 1.4.2 Sénescence rélicative et sénescence induite par les oncogènes .....                 | 4  |
| 1.4.3 Les radicaux libres dans la sénescence.....   | 5  |
| 1.4.3.1 Stress oxydatif.....  | 5  |
| 1.4.3.2 Effets antagonistes des ROS .....   | 6  |
| 1.4.4 L'effet de pléiotropie antagoniste de la sénescence.....                            | 6  |
| 1.5.1 Régulation du niveau de p53 dans la cellule et de sa stabilité.....                 | 8  |
| 1.5.2 Régulation du niveau de p53 dans la cellule par la traduction de son messager ..... | 8  |
| 1.6 L'initiation de la traduction chez les eucaryotes.....                                | 9  |
| 1.6.1 Le modèle de la traduction coiffe-dépendante et du balayage .....                   | 9  |
| 1.6.2 Le modèle du site d'entrée interne du ribosome (IRES) .....                         | 13 |
| 1.6.2.1 Les IRES des messagers viraux .....   | 13 |
| 1.6.2.2 Les IRES des messagers cellulaires.....   | 14 |
| 1.6.3 Le modèle du saut des ribosomes .....   | 17 |
| 1.7 Mécanismes de régulation de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante .....     | 18 |
| 1.7.1 Activation des répresseurs 4E-BP .....  | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 1.7.2 Phosphorylation du facteur eIF2 .....   | 18 |
| 1.7.3 Clivage des facteurs canoniques d'initiation .....  | 22 |
| 1.8 L'hypothèse de l'existence d'IRES chez l'ARNm de p53.....   | 23 |
| 1.9 p53 et son isoforme $\Delta$ Np53.....  | 27 |
| 1.10 Étude de l'activité des IRES de l'ARNm de p53 .....  | 30 |
| 1.10.1 Hypothèse.....   | 30 |
| 1.10.2 But de notre étude .....   | 31 |
| 1.10.3 La méthode du vecteur bicistronique comme système d'étude .....  | 31 |
| Chapitre II : Méthodologie.....   | 33 |
| 2.1 Construction des rapporteurs luciférases.....   | 33 |
| 2.2 Culture et transfection des cellules HEK293T .....  | 36 |
| 2.3 Infection des fibroblastes IMR90 .....  | 36 |
| 2.4 Sénescence induite par l'oncogène Ras dans les IMR90 .....  | 37 |
| 2.5 Mesure des activités luciférases .....  | 38 |
| Chapitre III: Résultats.....  | 41 |
| 3.1 Constructions bicistroniques nécessaires pour l'étude des IRES de p53.....  | 41 |
| 3.2 Les IRES de p53 ne présentent pas d'activité significativement différente des contrôles SERI.....                                     | 45 |
| 3.3 Les IRES de p53 présentent une activité significative par rapport au contrôle négatif pDual- $\Delta$ EMCV(CTL).....                  | 48 |
| 3.4 L'initiation de la traduction via les présumés IRES de p53 est négligeable par rapport à l'initiation coiffe-dépendante .....         | 54 |
| 3.5 L'activité apparente des IRES de p53 semble être principalement due à un faible épissage à partir de sites cryptiques d'épissage..... | 55 |
| Chapitre IV : Discussion.....   | 65 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1 Justification du projet et bref aperçu de résultats.....  | 65 |
| 4.2 Réexamen des données qui affirment l'existence d'un ou deux IRES dans l'ARNm de p53.....  | 66 |
| 4.2.1 L'étude de Das décrit deux régions IRES dans l'ARNm de p53 .....  | 66 |
| 4.2.2 L'étude de Yang s'oppose aux observations de Fahraeus concernant la présence d'un IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53.....                       | 73 |
| 4.2.2.1 L'étude de Yang décrit un IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53.....   | 73 |
| 4.2.2.2 L'étude de Fahraeus ne permet pas de mettre en évidence une activité IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53.....                                  | 76 |
| 4.2.3 Absence de certains contrôles lors de l'évaluation des activités des régions présumées IRES dans l'ARNm de p53.....                                     | 77 |
| 4.2.4 Critique de l'étude de l'activité IRES de p53 (en 5'UTR) dans la sénescence .....   | 78 |
| 4.3 Controverse concernant les IRES des messagers cellulaires.....  | 79 |
| 4.3.1 Critiques au sujet d'une activité IRES dans les messagers cellulaires.....  | 79 |
| 4.3.2 Caractéristiques des IRES des messagers viraux par rapport aux IRES des messagers cellulaires.....  | 80 |
| 4.3.3 Le saut du ribosome .....   | 81 |
| 4.3.4 Traduction des ARN messagers dans différentes conditions de stress.....   | 82 |
| 4.4 Modèle du recrutement des ribosomes via des éléments internes (CITE).....   | 82 |
| 4.4.1 Premières évidences d'une initiation de la traduction possible en absence des facteurs liant la coiffe .....  | 82 |
| 4.4.2 Modèle d'initiation de la traduction via les structures CITE chez les virus de plantes.....   | 83 |
| 4.4.3 Le domaine J-K de l'IRES de EMCV peut agir comme un élément d'initiation interne CITE chez les messagers cellulaires, en dehors du contexte d'IRES..... | 83 |
| 4.5 Éléments CITE issus possiblement d'une interaction entre les régions 5'UTR-3'UTR .....  | 87 |

|   |    |
|---|----|
| 4.5.1 Ce qu'on connaît de la régulation de l'expression génique via l'interaction des régions 5'-3' du messager ..... | 87 |
| 4.5.2 Interaction entre les régions 5'UTR et 3' UTR chez l'ARNm de p53.....   | 88 |
| 4.6 L'expression des gènes est plus versatile qu'on le pensait.....   | 88 |
| Conclusion et Perspectives.....   | 89 |
| Bibliographie .....   | I  |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1-1. Initiation de la traduction coiffe-dépendante (modèle du balayage).....  | 10 |
| Figure 1-2. Initiation de la traduction coiffe-dépendante vs. IRES-dépendante .....  | 15 |
| Figure 1-3. Mécanismes de contrôle de la traduction en conditions de stress cellulaire.....  | 20 |
| Figure 1-4. Localisation et structure des régions IRES de l'ARNm de p53.....   | 25 |
| Figure 1-5. Représentation des domaines de p53 et de son isoforme $\Delta Np53$ .....  | 28 |
| Figure 3-1. Système d'étude bicistronique utilisé dans l'étude des IRES de l'ARNm de p53.....  | 43 |
| Figure 3-2. Activité des différentes régions IRES d'intérêt de l'ARNm de p53 dans le système bicistronique. ....   | 46 |
| Figure 3-3. Activité des différentes régions IRES d'intérêt de l'ARNm de p53 dans le système bicistronique, après l'ajout d'une tige-boucle contrôle précédant la région IRES dans la région intercistronique..... | 49 |
| Figure 3-4. Expression de la luciférase Fluc via une initiation coiffe-dépendante vs. le mécanisme d'initiation présumé IRES-dépendant. ....   | 52 |
| Figure 3-5. Activité des différentes régions IRES d'intérêt de l'ARNm de p53 dans le système bicistronique, après l'ajout d'une structure en 5' du messenger, empêchant la traduction coiffe-dépendante.....       | 57 |
| Figure 3-6. Activité des présumés IRES de p53 dans la sénescence.....  | 63 |
| Figure 4-1. Modèle réconciliant l'étude du groupe de Das et notre étude en rapport avec une structure en tige-boucle en 5' du messenger bicistronique qui empêche la traduction de Rluc. .                         | 68 |
| Figure 4-2. Modèle additionnel expliquant l'expression de Fluc dans le système bicistronique du groupe de Das. ....  | 71 |
| Figure 4-3. Étude de l'IRES2 du messenger de p53 dans le système bicistronique.....  | 74 |
| Figure 4-4. Mécanismes d'initiation de la traduction de protéines chez les eucaryotes.....   | 85 |

## Liste des abréviations

40 S : petite sous-unité ribosomique eucaryote

43S : complexe de pré-initiation de la traduction chez les eucaryotes

60 S : grande sous-unité ribosomique eucaryote

80 S : ribosome mature eucaryote

Aa : acide aminé

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APAF-1: facteur 1 activateur des protéases apoptotiques; *apoptotic protease activating factor 1*

ARNm : Acide Ribonucléique messenger, ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>: ARN de transfert chargé de l'acide aminé méthionine initiateur

ATM : protéine kinase à Ser/Thr qui joue un rôle crucial dans l'induction de réponse aux dommages à l'ADN; *Ataxia telangiectasia mutated protein*

ATP: adénosine-5' triphosphate; *adenosine-5' triphosphate*

AUG: codon initiateur de la traduction

BRCA1/2: gène suppresseur de tumeur muté dans la majorité des cancers du sein héréditaires; *breast cancer type 1/2 susceptibility protein*

BYDV : virus du nanisme jaune de l'orge; *Barley yellow dwarf virus*

CDKi : protéine inhibitrice de kinases dépendantes des cyclines; *cyclin-dependent kinase inhibitor*

clAP2 : protéine inhibitrice de l'apoptose; *antiapoptotic cellular inhibitor of apoptosis protein 2*

CITE : élément stimulateur de la traduction coiffe-indépendante; *Cap Independent Translation Enhancers*

c-Myc : proto-oncogène surexprimé dans certains cancers humains; *cellular homolog of the retroviral v-myconcogene*

CrPV : virus de la paralysie du cricket; *Cricket paralyzes virus*

CT : domaine C-Terminal

DBD: domaine de liaison à l'ADN; *DNA-binding domain*

DENR: oncogène; *density-regulated protein*

eIF : facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes; *eukaryote initiation factor*

eIF1: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 1

eIF1A: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 1A

eIF2: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2

eIF2B: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2B

eIF3: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 3

eIF4A: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4A

eIF4B: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4B

eIF4E : facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E

eIF4E-BP: protéine qui lie eIF4E; *eIF4E-binding protein*

eIF4F: complexe interagissant avec la coiffe composé du facteur eIF4E, eIF4G et eIF4A; *eIF4F complex*

eIF4G: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4G

eIF5: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 5

eIF5B: facteur d'initiation de la traduction eucaryote 5B

EMCV: virus de l'encéphalomyocardite; *encephalomyocarditis virus*

G1 : phase de croissance cellulaire durant le cycle cellulaire

G2 : phase de croissance cellulaire et de préparation à la mitose durant le cycle cellulaire

GFP : protéine fluorescente verte; *green fluorescent protein*

GRO $\alpha$  (ou CXCL1) : facteur de croissance et cytokine chimioattractante; *growth related oncogene- $\alpha$*

GTP : Guanosine-5' triphosphate; *Guanosine-5'-triphosphate*

H1299 : lignée immortalisée issue d'un carcinome de poumon humain

HeLa : lignée immortalisée provenant d'un adénocarcinome du col de l'utérus humain

HEK293T : lignée immortalisée provenant des cellules épithéliales de rein embryonnaire humain transformées par l'adénovirus E1A et exprimant de manière stable l'antigène T du virus simien SV40

HIF- $\alpha$  : facteur impliqué dans la signalisation en conditions d'hypoxie ; *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

IL-4 : cytokine interleukine 4; *interleukine 4*

IL-6 : cytokine interleukine 6; *interleukine 6*

IL-8 : cytokine interleukine 8; *interleukine 8*

IL-10 : cytokine interleukine 10; *interleukine 10*

IMR90 : lignée cellulaire primaire de fibroblastes de poumon fœtal humain

INPP4B : enzyme impliquée dans la signalisation via un phospholipide membranaire phosphatidyl-inositol-diphosphate; *inositol polyphosphate 4-phosphatase type II*

IRES : site d'entrée interne du ribosome; *Internal Ribosomal Entry Site*

ITAF : protéine liant l'IRES; *IRES trans-acting factor*



L1 : retrotransposon de la famille LINE; *LINE-1 retrotransposon*

L26 (RPL26) : protéine ribosomique de la sous-unité 60S; *ribosomal protein L26*

M (phase) : phase durant laquelle a lieu la mitose; *mitotic phase*

MCF-7: lignée immortalisée provenant d'un adénocarcinome de sein humain

MCT-1: oncogène surexprimés dans certains types de lymphomes; *Multiple copies in T-cell malignancy 1*

Mdm-2 : protéine qui joue le rôle d'ubiquitine ligase pour p53; *Mouse double minute 2 homolog*

MEF : lignée cellulaire primaire, fibroblastes embryonnaires de souris; *mouse embryonic fibroblast*

Met : méthionine

m<sup>7</sup>GpppN: coiffe; *cap*

MMTV : virus de tumeur mammaire murine; *mouse mammary tumour virus*

NADPH oxydase : complexe enzymatique d'oxydation impliqué dans la respiration cellulaire; *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NF1 : gène suppresseur de tumeur responsable de la maladie nommée neurofibromatose de type 1; *Neurofibromatosis Type 1 gene*

NLS : signal de localisation au noyau; *nuclear localization signal*

p16 : inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines

p21 : inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines

p53 : facteur de transcription, suppresseur de tumeur, « gardien du génome », régulateur de l'apoptose et de la sénescence

$\Delta$ Np53 : isoforme de p53 dépourvu du domaine N-terminal

PABP : protéine liant la queue poly(A); *poly(A) binding protein*

PERK : kinase transmembranaire localisée dans le réticulum endoplasmique; *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*

PPC : virus de la peste porcine classique

PRR : région riche en proline; *proline rich region*

PTB : protéine liant une suite de résidus de pyrimidine; *polypyrimidine tract-binding protein*

PTEN : protéine suppresseur de tumeur, phosphatase cytoplasmique; *Phosphatase and tensin homolog*

Ras (HRAS<sup>G12V</sup>) : protéine associée à la transformation cellulaire (oncogène)

RB1 : gène codant pour la protéine du rétinoblastome; *the retinoblastoma protein*

ROS: espèces réactives d'oxygène; *reactive oxygen species*

RSV : virus de sarcome de Rous; *Rous sarcoma virus*

RUNX2 : gène codant pour un facteur de transcription de la famille RUNX; *Runt-related transcription factor 2*

S (phase) : phase du cycle cellulaire durant laquelle il y a réplication d'ADN; *synthesis phase*

SA-βgal : enzyme β-galactosidase sécrétée par les cellules sénescents; *senescence-associated β-galactosidase*

SADF : phénotype particulier de l'hétérochromatine organisée en *foci* contenant de l'ADN endommagé ; *senescence-associated DNA-damaged foci*

SASP : phénotype de sécrétion associé à la sénescence; *senescence-associated secretory phenotype*

SERI : séquence complémentaire inversée de l'IRES

SHAPE : technique d'analyse structurale des ARN; *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*

TAD : domaine de transactivation; *trans-activating domain*

TET : domaine de tétramérisation

TGF- $\beta$  : facteur qui contrôle entre-autres la différenciation cellulaire et la prolifération;  
*Transforming growth factor beta*

TNF- $\alpha$  : facteur alpha de nécrose tumorale, cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'inflammation et dans la mort cellulaire par nécrose; *tumor necrosis factor alpha*

UTR : région non-traduite; *untranslated region*

5'UTR : région non-traduite en 5' du messager

3'UTR : région non-traduite en 3' du messager

UV: radiations ultraviolettes; *ultraviolet light*

VEGF : facteur de croissance cellulaire qui régule l'angiogenèse, la croissance du squelette, les fonctions de reproduction etc.; *Vascular endothelial growth factor*

VHC : virus de l'hépatite C

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

VIH-2 : virus de l'immunodéficience humaine de type 2

XIAP : protéine inhibitrice de l'apoptose dont le gène se trouve sur le chromosome X;  
*X chromosome linked inhibitor of apoptosis protein*



*À mes grands-parents*

## Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier le Dr Gerardo Ferbeyre, directeur de recherche de ce mémoire, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, au départ comme stagiaire, et qui ensuite m'a donné l'opportunité de poursuivre une maîtrise en recherche. Je vous remercie également pour le soutien financier de ce projet ainsi que pour le support critique et moral offerts. J'exprime toute ma reconnaissance à ma co-directrice Dre Léa Brakier-Gingras, de m'avoir si bien accueillie dans son laboratoire ainsi que pour le soutien financier. Je vous suis également très reconnaissante pour votre écoute, votre patience, vos suggestions et critiques et votre disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement le groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM) pour la bourse de maîtrise offerte.

J'exprime également ma gratitude aux personnes qui ont contribué à mon encadrement au laboratoire. Premièrement, à Johanie, pour avoir partagé son expérience, pour tous les détails techniques ainsi que pour les conseils précieux et les critiques pertinentes. Deuxièmement, je remercie Geneviève, Véronique et Olga pour l'initiation aux nouvelles techniques de laboratoire, leurs conseils et l'encadrement offert.

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous les autres membres du laboratoire du Dr. Ferbeyre, Marie-France, Frédéric, Sébastien, Xavier, Mathieu, Emma, Lian et Mariana, pour votre amitié, vos mots d'encouragement et vos anecdotes lorsque je perdais mon sourire. Merci également à Sébastien et Rémy pour leurs nombreuses visites de soir lorsque le travail me retenait tard au laboratoire.

Finalement, je tiens à remercier mes parents pour le support financier offert et d'avoir insisté sur l'importance de mon cheminement académique. Je remercie mon copain pour son soutien et sa patience. Je n'oublie pas mes grands-parents maternels, tout particulièrement, source d'inspiration et modèle d'équilibre dans la vie, qui m'ont donné le goût de poursuivre une formation en sciences.

# Chapitre I : Introduction

## 1.1 La problématique

Le développement accéléré de nos jours, tant au niveau scientifique que technologique, semble promettre à l'humanité une meilleure qualité de vie, ainsi qu'une espérance de vie prolongée. Les répercussions d'un tel développement se font ressentir de plus en plus dans le quotidien des pays développés, ainsi que dans les pays en voie en développement, confrontés à un vieillissement important de la population [1]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, entre 2000 et 2050, le pourcentage de la population mondiale âgée doublera, pour les personnes âgées de 60 ans ou plus, et sera multiplié par quatre, pour les personnes âgées de 80 ans ou plus [2]. Vieillir en santé n'est pas impossible mais cela demande d'être vigilant, car le vieillissement est accompagné d'un risque élevé de cancer qui augmente avec l'âge [3,4]. Tout au long de sa vie, l'être humain est constamment exposé aux nombreux stress tels que les radiations UV du soleil, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'infection par un virus, la consommation des médicaments, les stress psychologiques etc. [5]. Une combinaison de tous ces facteurs fragilise notre génome et augmente le risque de développer un cancer. Heureusement, il existe des mécanismes de protection de notre corps contre tous ces dangers. Ces mécanismes sont très complexes et ils engagent plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent les stress et réparent les dommages induits.

## 1.2 P53, le « gardien du génome »

P53, ATM, BRCA1 et BRCA2 sont des gènes qui jouent un rôle crucial dans les différentes réponses face aux dommages à l'ADN. Des mutations dans ces gènes conduisent à un nombre élevé de cancers [6]. Le gène de p53, qui code pour la protéine p53 et qui est surnommé aussi le « gardien du génome » [7], se trouve parmi les gènes les plus étudiés par la communauté scientifique. Ce n'est pas surprenant que l'intérêt pour la protéine p53 soit élevé, car 50% des cancers comportent des mutations dans son gène [8,9] et la transmission dans la lignée germinale du gène de p53 comportant des mutations augmente la probabilité de développer

des tumeurs [10-12]. La capacité de p53 de supprimer les tumeurs est soulignée dans plusieurs travaux où la restauration de p53 dans des tumeurs malignes et pré-malignes supprime les mécanismes tumoraux [13-16]. Les deux mécanismes de suppression de tumeurs connus pour être principalement régulés par p53, sont la sénescence et l'apoptose [17,18]. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, éliminant les cellules qui ont subi des mutations potentiellement oncogéniques, tandis que la sénescence cellulaire constitue une barrière contre les tumeurs en induisant un arrêt permanent du cycle cellulaire. Dans cette étude, nous nous intéressons uniquement au mécanisme de sénescence régulé par p53 (voir plus loin, section 1.4).

### **1.3 Une balance fine entre la suppression de tumeurs et la longévité**

Tout en protégeant le génome humain contre les dommages, p53 maintient soigneusement la balance fine entre la suppression de tumeurs et la longévité [19]. Des études chez la souris indiquent qu'un niveau de p53 maintenu constamment élevé dans l'organisme protège efficacement contre le cancer, mais au coût de la dégénérescence des organes et du vieillissement prématuré de la souris [20-23]. Par contre, les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, causé par des mutations germinales dans le gène de p53, développent de nombreuses tumeurs à un jeune âge [12]. Tout comme ces études, d'autres concluent également que l'activité de suppression de tumeurs de p53 est essentielle pour les organismes qui vivent longtemps [24]. Cependant, son implication dans le vieillissement est peu connue et peu caractérisée, bien que des preuves de cette implication existent [25]. Par exemple, les dommages persistants à l'ADN entraînant un niveau élevé de p53, tel qu'observé chez les patients atteints du syndrome de Cockayne, un syndrome pouvant accélérer la dégénérescence des tissus, un phénotype rencontré dans le vieillissement [26].



## 1.4 Vieillessement et sénescence

Plusieurs études *in vivo* montrent que le vieillissement entraîne l'accumulation de cellules sénescentes [27-32]. La sénescence cellulaire a été étudiée pour la première fois en 1965 par Leonard Hayflick chez des fibroblastes primaires humains en culture [33]. C'est ce qu'on appelle la sénescence répliquative induite après un nombre limité de divisions cellulaires. La sénescence est l'état d'arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1 où la cellule reste métaboliquement active [34]. Cet état est différent de l'état de quiescence cellulaire caractérisé par l'arrêt réversible du cycle cellulaire en phase G1 accompagné par un métabolisme faible [35]. De nombreuses études ont approfondi le phénomène de sénescence chez la souris et chez l'humain [36]. Plusieurs facteurs peuvent induire une sénescence cellulaire. On connaît la sénescence répliquative, la sénescence induite par l'activation des oncogènes (tel Ras) ou par la perte de certains suppresseurs de tumeurs (PTEN, INPP4B, NF1, RB1) [37-41].

### 1.4.1 Marqueurs de la sénescence

Plusieurs marqueurs permettent d'identifier les cellules sénescentes : la morphologie des cellules (larges et aplaties), l'expression augmentée de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal), l'expression d'inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines et régulateurs du cycle cellulaire (CDKi), tel que p16 et p21, un phénotype particulier de l'hétérochromatine organisée en foyers d'ADN endommagé (SADF) et un phénotype de sécrétion associé à la sénescence (SASP) [37]. Les différents modèles de sénescence présentent de marqueurs différents. Les chercheurs utilisent plusieurs marqueurs pour mettre en évidence l'état de sénescence des cellules. Par ailleurs, p16 et p21 sont aussi considérés comme des biomarqueurs du vieillissement [42].

### 1.4.2 Sénescence rélicative et sénescence induite par les oncogènes

La sénescence rélicative et la sénescence induite par les oncogènes sont deux modèles de sénescence les mieux documentés dans la littérature. La sénescence rélicative est induite par l'érosion graduelle des télomères durant les cycles de division cellulaire [43,44]. Les télomères sont des séquences d'ADN situées aux extrémités des chromosomes. À chaque phase S du cycle de division cellulaire, une partie de télomères (environ 50-200 paires de bases) est perdue sur le brin retardé à l'extrémité 5' car les polymérase qui répliquent l'ADN sont unidirectionnelles [44]. Également, la plupart des cellules ne possèdent pas l'enzyme télomérase qui répare les télomères [44,45]. L'érosion de télomères entraîne une accumulation de dommages à l'ADN, vus par la cellule comme des cassures double brin [46], et une augmentation de l'expression d'inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines comme p16.

La sénescence induite par les oncogènes a été premièrement évoquée comme un mécanisme qui empêche la transformation par les oncogènes *in vitro* [47]. Des études de différents modèles de souris ainsi que des études de la sénescence induite par la surexpression de l'oncogène HRAS<sup>G12V</sup> dans les fibroblastes humains ont montré que ce modèle de sénescence est induit suite à l'hyper-prolifération cellulaire et l'hyper-réplication d'ADN. Cela entraîne des cassures double brin d'ADN, la formation prématurée d'origines de réplication et la terminaison prématurée des fourches de réplication, ce qui cause une forte réponse aux dommages à l'ADN [48-53]. En réponses aux dommages à l'ADN (sénescence rélicative; induite par les oncogènes), p53 est activé par des modifications post-traductionnelles, telle que la phosphorylation [52,54], mais également par l'augmentation de sa stabilité [55] et l'induction de sa synthèse (voir section 1.8) [56,57].

Les cellules sénescents sont généralement éliminées par le système immunitaire [13,58]. Les causes de leur accumulation dans le vieillissement ne sont pas encore établies mais diverses hypothèses ont été émises: par exemple, en vieillissant, le système immunitaire serait moins efficace ou bien le taux d'apparition de cellules sénescents serait plus rapide que le taux de leur élimination [37].

### 1.4.3 Les radicaux libres dans la sénescence

Si on considère la « théorie des radicaux libres » [59,60] dans le vieillissement, la dégénérescence des organes est liée à l'oxydation des composantes cellulaires. Cette théorie est soutenue par l'observation des systèmes d'antioxydation endogènes, tel que le glutathion, qui diminuent avec l'âge [61]. Tout comme dans le vieillissement, l'oxydation pourrait jouer un rôle au niveau de la sénescence cellulaire. Bien que les évidences soient peu nombreuses et peu caractérisées, la sénescence serait en effet accompagnée d'une accumulation d'espèces réactives d'oxygène (ROS), ce qui représente un stress oxydatif pour la cellule [62,63].

#### 1.4.3.1 Stress oxydatif

Les mitochondries représentent une source significative de ROS suite à l'activité régulière de la chaîne respiratoire [64,65]. Heureusement, les ROS sont généralement efficacement réduits et éliminés via les nombreux systèmes d'antioxydation contrôlés par divers enzymes : la superoxyde dismutase, la catalase, les peroxydases et les molécules non-enzymatiques (vitamine C, glutathion). Cependant, s'il y a accumulation de ROS dans une cellule, cela représente un stress oxydatif [66,67]. Le stress oxydatif entraîne l'oxydation des protéines et des acides nucléiques et peut avoir des répercussions graves telles que la perte de fonction des protéines et les dommages à l'ADN mitochondrial et génomique. Dans ces conditions, le système de réparation et de renouvellement cellulaire peut être gravement affecté. Les conséquences d'un tel stress, se refléteraient dans la perte de fonction des tissus et des organes, signes du vieillissement de l'organisme.

Certaines études indiquent que la sénescence répliquative et la sénescence induite par les oncogènes sont modulées par les ROS [68]. De plus, il a été montré qu'un stress oxydatif induit une sénescence prématurée dans des fibroblastes en culture [69-71]. Bien que la source, le rôle et le mécanisme des ROS dans la sénescence ne soient pas encore bien caractérisés, il est de plus en plus évident qu'un stress oxydatif initie, maintient et/ou accompagne la sénescence cellulaire [72].

### **1.4.3.2 Effets antagonistes des ROS**

Les ROS peuvent toutefois avoir des effets antagonistes, tout dépendamment de leur concentration [73]. Ils peuvent agir comme médiateurs sur la croissance et la prolifération cellulaire ou induire des dommages dans la cellule [74,75]. Une source principale de ROS agissant comme médiateurs est l'enzyme NADPH oxydase associée à la membrane cellulaire. Celle-ci produit des ROS localement, tel que l'ion superoxyde et/ou le peroxyde d'hydrogène, qui sont impliqués dans l'expression génique, le remodelage du cytosquelette, la prolifération, la différenciation cellulaire et la mort cellulaire [76-78].

### **1.4.4 L'effet de pléiotropie antagoniste de la sénescence**

La découverte des cellules sénescents dans les tumeurs pré-malignes a soulevé l'intérêt des chercheurs. Cela suggère que la sénescence bloque le développement d'une tumeur lorsqu'elle est encore bénigne [79]. Aussi, la réexpression de p53 chez la souris conduit à la régression des tumeurs via le recrutement des cellules du système immunitaire [13,15]. Cependant, d'autres études ont montré le côté sombre du programme de sénescence caractérisé par la sécrétion de nombreuses cytokines et facteurs pro-inflammatoires tel que IL-6, IL-8, VEGF, GRO $\alpha$  et l'amphiréguline, qui font partie du phénotype de sécrétion SASP [80-86]. Il existe un lien direct entre l'inflammation chronique et le développement de nouvelles tumeurs [87]. Le phénotype de sécrétion des cellules sénescents peut changer le milieu environnant et le comportement des cellules avoisinantes. Les leucocytes pro-inflammatoires, recrutés possiblement en réponse aux cytokines sécrétées par les cellules sénescents, libèrent des espèces réactives de l'oxygène, qui constituent un stress oxydatif pour les cellules normales environnantes, ainsi que des cytokines stimulant la croissance cellulaire, tel que IL-4, IL-6, IL-10, les facteurs TGF- $\beta$  et TNF- $\alpha$  [13,15]. Par conséquent, l'environnement des cellules sénescents favorise l'altération et l'instabilité génomique, l'apparition de mutations dangereuses et, éventuellement, de cellules cancéreuses. D'ailleurs, la co-injection de fibroblastes sénescents et de cellules épithéliales d'une tumeur pré-maligne conduit à la formation de tumeurs xénogreffées chez la souris [88]. Des études similaires de co-injection de fibroblastes

sénescents et de cellules d'une tumeur maligne cette fois-ci montrent une augmentation du taux d'apparition de tumeurs xénogreffées [80,88-90].

La littérature sur la sénescence englobe son effet de pléiotropie antagoniste, c'est-à-dire, la double identité de la sénescence [91]. Elle peut être bénéfique chez les organismes jeunes car elle supprime les tumeurs, mais elle peut être dangereuse à long terme chez les organismes plus âgés car elle induit un vieillissement des organes et peut initier de nouvelles tumeurs.

## **1.5 Intégration des signaux cellulaires par p53 et modulation de son activité physiologique**

La dualité et la complexité de la sénescence sont certainement reliées à p53 qui a de nombreux rôles dans la cellule. p53 est un facteur de transcription et il module la transcription des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire et dans les mécanismes de suppression de tumeurs tels que l'apoptose et la sénescence [17]. La capacité de p53 de réguler des fonctions aussi variées est reliée au fait que p53 oligomérisse en un tétramère. Ce dernier peut être composé de différents isoformes produits à partir du gène de p53 par des promoteurs ou par épissage alternatifs [92] et aussi par une initiation alternative de la traduction (pour ce dernier point, voir section 1.8)[93]. Selon sa composition, le tétramère p53 se lie à des séquences d'ADN spécifiques et régule la transcription de plus d'une centaine de gènes différents [94,95]. Les mécanismes médiés par p53 dans la cellule varient en fonction de plusieurs facteurs dont le type cellulaire, le degré de dommages à l'ADN, l'intensité et la durée du signal, le niveau de p53, les gènes cibles induits etc. [96,97]. Par exemple, p53 induit l'apoptose dans certains types cellulaires, mais cause l'arrêt du cycle cellulaire dans d'autres types cellulaires, en réponse au même stress [96,97].

### **1.5.1 Régulation du niveau de p53 dans la cellule et de sa stabilité**

En conditions normales, le niveau de p53 est maintenu faible dans la cellule par son régulateur Mdm2, une ubiquitine ligase qui induit la dégradation de p53 via le protéasome [98-100]. En outre, p53 est maintenu à l'état inactif dans des conditions normales [11]. Lorsqu'un organisme est soumis à des stress qui induisent des dommages à l'ADN, tel que les radiations ionisantes, les rayons UV, le stress oxydatif, les agents chimiothérapeutiques, l'hypoxie ou le stress oncogénique, le niveau de p53 et son activité augmentent rapidement dans la cellule [6,101-104]. D'ailleurs, il a été montré que le niveau et/ou l'activité de p53 augmentent dans les cellules sénescentes [47]. L'activation de p53 se fait principalement via des modifications post-traductionnelles qui augmentent la stabilité et l'activité de p53 [55]. Par exemple, la phosphorylation et l'acétylation sont les deux principales modifications post-traductionnelles qui augmentent la stabilité de p53 et son accumulation dans le noyau, tout en favorisant son activité de régulateur transcriptionnel [105,106]. La phosphorylation des sites en N-terminal de p53 augmente la stabilité de p53. Cela inhibe l'interaction entre p53 et Mdm2, qui entraînerait autrement sa dégradation [107]. L'activation de p53 en conditions de stress cellulaire conduit à son accumulation dans le noyau où il exerce son rôle de régulateur transcriptionnel [108].

### **1.5.2 Régulation du niveau de p53 dans la cellule par la traduction de son messenger**

L'augmentation du niveau de p53 dans la cellule en conditions de stress cellulaire peut être influencée aussi par le niveau de traduction de son ARN messenger (ARNm) par les ribosomes [109]. Deux études indépendantes rapportent que l'augmentation de la traduction de l'ARNm de p53 constitue un point important pour l'induction optimale de p53 en conditions de dommages à l'ADN (induits par l'irradiation, l'étoposide) [56,110]. Cependant, on sait qu'en conditions de stress cellulaire telles que l'irradiation, l'hypoxie ou le stress oxydatif accompagnant la sénescence, on assiste à une répression de la traduction canonique globale de protéines [111-113]. La répression de la traduction en conditions de stress cellulaire a lieu au niveau de l'initiation qui est l'étape limitante de la traduction [114].

## 1.6 L'initiation de la traduction chez les eucaryotes

La traduction des ARNm en protéines est la dernière étape d'un réseau complexe de mécanismes qui régulent l'expression des gènes. Le contrôle au niveau de la traduction, plutôt qu'au niveau de la transcription, est très important lors des changements des conditions physiologiques car il permet une réponse rapide et immédiate [115]. La section présente un résumé des données actuelles sur l'initiation de la traduction des ARNm eucaryotes en protéines. La traduction est un processus complexe qu'on peut diviser en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Brièvement, durant l'étape d'initiation, on assiste au recrutement des sous-unités ribosomiques (40S et 60S), à l'assemblage du ribosome (80S) sur un ARNm et à la reconnaissance d'un codon d'initiation. Durant l'étape d'élongation, le ribosome choisit des ARN de transfert (ARNt) aminoacylés suivant les directives de l'ARNm et catalyse la formation d'un lien peptidique entre la chaîne peptidique nouvellement synthétisée et le nouvel acide aminé choisi. L'étape de terminaison a lieu lorsque le ribosome rencontre un codon de terminaison qui conduit au relâchement de la chaîne peptidique synthétisée et à la dissociation du ribosome en 40S et 60S. Chez les eucaryotes, l'initiation de la traduction est généralement l'étape la plus régulée qui contrôle la synthèse de protéines [116,117].

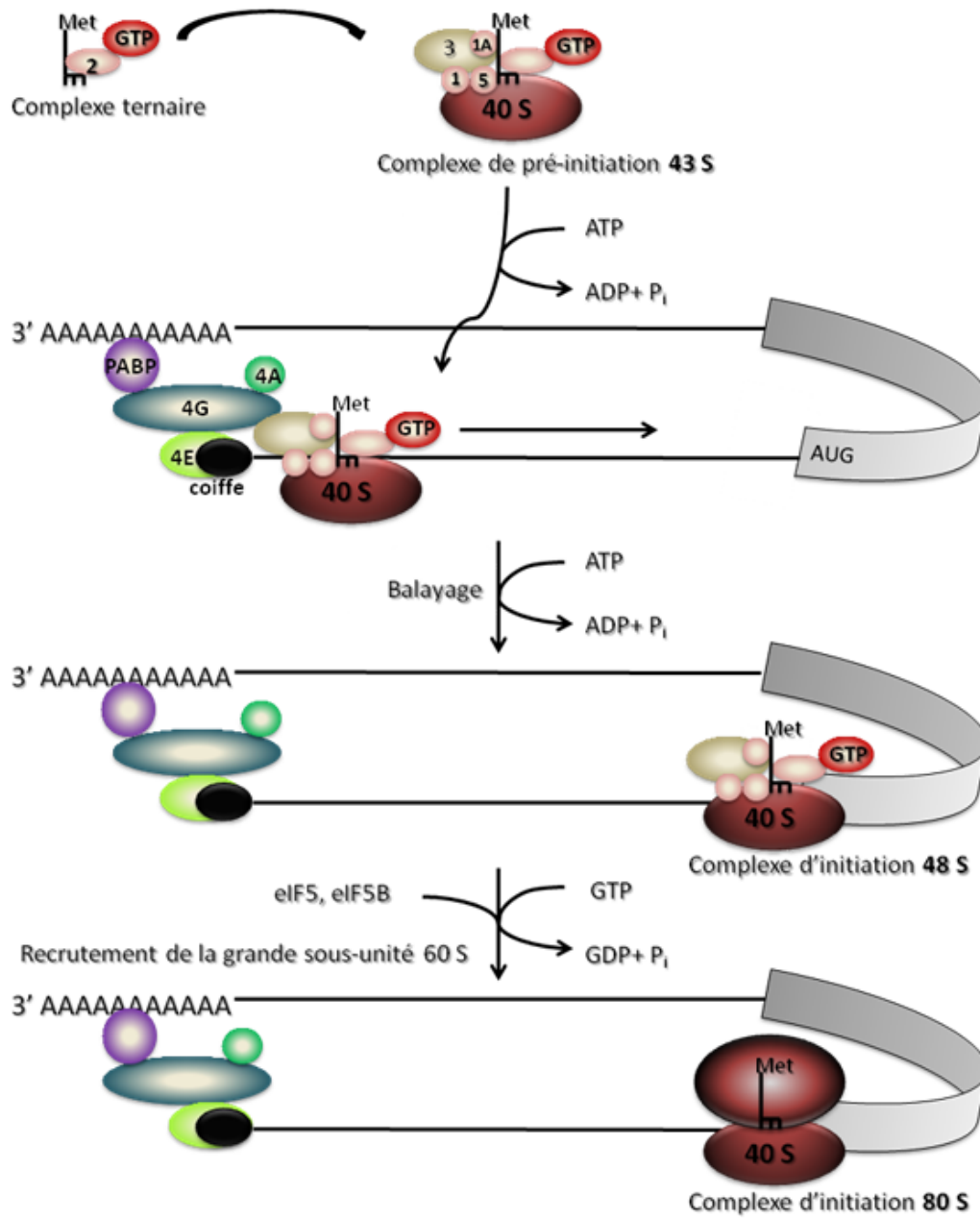
### 1.6.1 Le modèle de la traduction coiffe-dépendante et du balayage

Tous les ARNm eucaryotes possèdent une structure en 5' appelée coiffe, soit la 7-méthylguanosine liée au nucléotide suivant, N, par un lien 5'-5' triphosphate ( $m^7GpppN$ ). La coiffe est suivie d'une région appelée région non-traduite en 5' de l'ARNm (5'UTR) composée d'un nombre variable de nucléotides (entre 50-120 mais pouvant dépasser ce nombre), différents d'un messenger à l'autre [118]. La région 5'UTR est suivie de la région codante qui, comme son nom l'indique, contient l'information pour synthétiser la protéine correspondant à l'ARNm. Ensuite, il y a une autre région non-traduite de taille variable et suivie de résidus adénylés (queue poly-A) en 3' du messenger (3'UTR). Chez les eucaryotes, l'initiation de la traduction de protéines a lieu généralement selon le

**Figure 1-1. Initiation de la traduction coiffe-dépendante (modèle du balayage).**

Adapté d'après F. Gebauer & M. W. Hentze [119]. Certains facteurs d'initiation qui présentent moins d'intérêt pour cette étude ont été omis au profit de la simplicité. Pour plus de détails, voir le texte (section 1.6.1) et les revues [120-122].





modèle proposé par Kozak [123], soit le modèle du balayage dépendant de la coiffe. Brièvement, la petite sous-unité ribosomique 40S est recrutée à la coiffe en 5' à l'aide de plusieurs facteurs d'initiation (eIF) et, par la suite, elle balaye la région 5'UTR en direction 3' jusqu'à la rencontre d'un codon initiateur (AUG) dans un contexte approprié (voir revues [120-122,124,125]).

Un regard plus détaillé sur le modèle du balayage dépendant de la coiffe (figure 1-1) nous apprend que, dans un premier temps, un complexe ternaire est constitué par le facteur d'initiation eIF2, une molécule de GTP et l'ARNt chargé de méthionine nécessaire à la reconnaissance du codon initiateur, Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Ce complexe (eIF2•GTP•Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>) est recruté par la sous-unité 40S déjà associée aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 et forme le complexe de pré-initiation 43S. Les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 stabilisent le complexe 43S. Ce dernier est ensuite recruté à la coiffe en 5' de l'ARNm grâce à son interaction avec le complexe eIF4F, qui interagit avec la coiffe. Le complexe eIF4F est composé de eIF4E qui reconnaît la coiffe, de l'hélicase eIF4A et de eIF4G qui sert d'échafaud et qui interagit avec eIF4E, eIF4A et eIF3. Le facteur eIF4A déroule les structures secondaires de l'ARNm durant le balayage de la région 5'UTR par le complexe 43S. Le processus du recrutement du complexe 43S à la coiffe est médié par l'interaction entre eIF3 et eIF4G et stimulé par la circularisation du messenger. Cette circularisation résulte de l'interaction entre la protéine PABP qui lie la queue de poly-A en 3' et le facteur eIF4G en 5' du messenger. Ce phénomène amène le 3'UTR en proximité du 5'UTR. Durant le balayage, le facteur eIF4B stimule l'activité de l'hélicase eIF4A. Lorsque le ribosome rencontre un codon initiateur dans le contexte Kozak (...A/GNNAUGG/A... chez les vertébrés), les facteurs eIF1 et eIF1A vérifient la précision de l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Par la suite, on assiste à l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 par eIF5, à la dissociation des facteurs d'initiation, au recrutement et à l'association de la sous-unité 60S pour former le ribosome 80S capable de catalyser des liens peptidiques, association s'accompagnant aussi de l'hydrolyse de GTP catalysée par eIF5B [120-122,124,125]. Le modèle du balayage du ribosome, aussi nommé initiation coiffe-dépendante, proposé par Kozak, dépend absolument de la présence des protéines interagissant avec la coiffe, soit le complexe eIF4F, puisque le balayage ne peut se faire qu'une fois le ribosome lié à la coiffe via eIF4G.

## **1.6.2 Le modèle du site d'entrée interne du ribosome (IRES)**

Plusieurs études ont montré qu'un autre mode d'initiation de traduction existe, qui est indépendant de la coiffe et des protéines interagissant avec la coiffe (figure 1-2). Il est médié par des régions spécifiques désignées sites d'entrée interne du ribosome (IRES) [126-128] qui se trouvent généralement dans la région non-traduite en 5' de l'ARNm, à proximité du codon initiateur, et qui comportent des motifs très structurés [129]. Les premiers IRES ont été identifiés chez les picornavirus, une catégorie de virus à ARN dépourvus de coiffe tel que le virus de poliomyélite et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) [129,130], ensuite chez de nombreux autres virus tels que le virus de l'hépatite C (VHC)[131], le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH-1, VIH-2) [132,133], le virus du sarcome de Rous (RSV) [134], le virus de tumeur mammaire murine (MMTV) [135] et finalement chez des ARNm cellulaires [136-139]. Un grand nombre d'ARNm cellulaires contenant un IRES code pour des protéines qui jouent un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose [114]. Présentement, il a été suggéré que 10-15% d'ARNm cellulaires pourraient contenir un IRES [140].

### **1.6.2.1 Les IRES des messagers viraux**

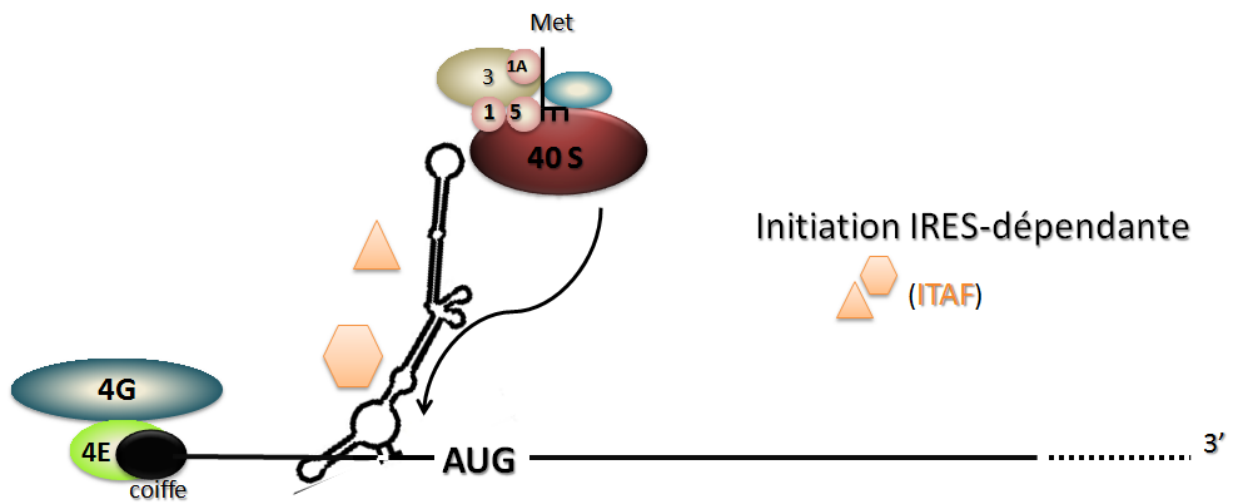
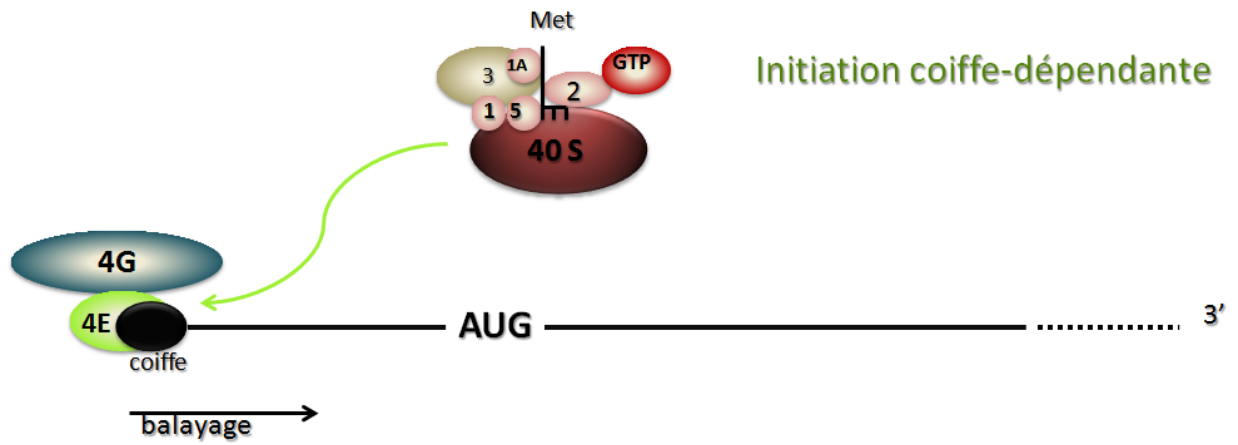
Une caractéristique des messagers viraux est souvent l'absence de la coiffe (chez les picornavirus, pestivirus et certains flavivirus), la présence de plusieurs codons AUG avant le vrai codon initiateur et la présence d'une région 5'UTR longue et très structurée, riche en GC et présentant des motifs très stables [141,142]. Ces conditions ne favorisent pas une initiation de la traduction efficace via la coiffe, suivie d'un balayage. Selon la littérature, les IRES viraux sont des structures dans le messenger viral capables de recruter le ribosome indépendamment de la présence de la coiffe et de la disponibilité de certains facteurs canoniques. Les facteurs canoniques nécessaires à l'initiation interne varient selon l'IRES viral. Le recrutement de la sous-unité 40S via les IRES du virus de l'hépatite C (VHC) et de la peste porcine classique (PPC) n'implique aucun des facteurs du complexe eIF4F [143]. De plus, l'initiation interne dans la région dite intergénique chez le virus de la paralysie du cricket (CrPV) ne requiert aucun facteur

d'initiation canonique [144,145]. Le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S à l'IRES viral peut se produire donc par l'interaction directe entre l'ARNm et la 40S (PPC, VHC, CrPV), ou bien cette interaction est modulée par l'action des ITAF (IRES trans-acting factor) ou par des facteurs canoniques d'initiation [142,146]. Les ITAF sont des protéines cellulaires qui lient l'ARN, ont de nombreux rôles dans une cellule et modèleraient la conformation des IRES viraux ou cellulaires, pour favoriser ou inhiber la liaison des ribosomes [146-148]. Le recrutement des ribosomes aux IRES implique également l'association à la 40S du complexe ternaire eIF2•GTP•Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Mais il arrive que eIF2 soit inactivé lors d'une infection virale. D'autres facteurs peuvent alors le remplacer et amener l'ARNt initiateur chargé de méthionine à la sous-unité 40S (voir section 1.7.2).

### **1.6.2.2 Les IRES des messagers cellulaires**

Les IRES des messagers cellulaires qui ont été découverts se trouvent principalement chez des messagers qui codent pour des protéines régulatrices de la croissance ou enclenchant une réponse à divers stress et qui ont une région 5'UTR souvent très structurée et complexe [149]. La découverte des IRES a permis de mieux comprendre l'initiation de la traduction en présence des régions structurées en 5'UTR, régions connues pour interférer avec le balayage du ribosome [149,150]. L'initiation de la traduction IRES-dépendante des messagers cellulaires se manifesterait lorsque la traduction coiffe-dépendante est grandement réprimée en conditions de stress cellulaire pour favoriser la traduction de protéines spécifiques [146], comme en phase G2 du cycle cellulaire [151], en hypoxie [152,153], durant l'apoptose [148] et même durant le développement [154]. Une balance fine entre la traduction coiffe-dépendante et celle via un IRES serait nécessaire pour maintenir un équilibre traductionnel dans la cellule [114,142].

**Figure 1-2. Initiation de la traduction coiffe-dépendante vs. IRES-dépendante**  
(voir texte, sections 1.6.1 et 1.6.2)



### 1.6.3 Le modèle du saut des ribosomes

L'initiation via un IRES permet au ribosome de contourner des structures d'un ARNm qui s'opposent au balayage en positionnant le ribosome à proximité de l'AUG initiateur. Il existe cependant un autre moyen de contourner ce genre de structures. C'est le modèle du saut des ribosomes rencontré chez les virus (de plantes) de la famille Caulimoviridae [155-157] ainsi que chez le virus Sendai [158] et chez l'adénovirus [159]. Dans le contexte du saut, la sous-unité ribosomique 40S est recrutée à l'aide des facteurs canoniques d'initiation au niveau de la coiffe en 5' de l'ARNm et commence à balayer le messager jusqu'à la rencontre du codon initiateur. Cependant, lorsque la 40S rencontre des structures secondaires difficiles à dérouler, elle est plutôt propulsée en aval de ces dernières, tout au long du 5'UTR, jusqu'à l'atteinte du codon initiateur. Ce mécanisme évite au ribosome d'être freiné ou même bloqué par des structures inhibitrices. Par contre, le modèle du saut est peu caractérisé et peu rencontré chez les mammifères. Un premier cas de saut rapporté pour les messagers eucaryotes dans la littérature comprend la traduction du messager de la protéine HSP70 en conditions de choc thermique [160], bien que le mécanisme prédominant en conditions normales soit le modèle classique du balayage. Le second cas concerne le messager de la protéine anti-apoptotique cIAP2, traduit exclusivement via le mécanisme de saut tant en conditions normales qu'en conditions de stress [161].

## 1.7 Mécanismes de régulation de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante

Deux mécanismes principaux sont connus pour contrôler l'initiation de la traduction dite coiffe-dépendante en conditions de stress cellulaire et les deux dépendent de l'état de phosphorylation des facteurs impliqués. Le premier mécanisme empêche le recrutement du complexe ribosomique 43S à l'ARNm tandis que le deuxième contrôle la formation du complexe ternaire (figure 1-3).

### 1.7.1 Activation des répresseurs 4E-BP

L'inhibition du recrutement du complexe ribosomique 43S à l'ARNm se fait via l'activation des répresseurs (4E-BP) du facteur de reconnaissance de la coiffe eIF4E (ou 4E) [162], comme par exemple lors de l'infection virale par des picornavirus tel que EMCV [163,164]. L'infection virale provoque la déphosphorylation des 4E-BP. Sous la forme déphosphorylée, 4E-BP séquestre le facteur 4E, ce qui interfère avec sa liaison à la coiffe et au facteur d'échafaudage 4G [164,165]. Ce mécanisme empêche la formation du complexe eIF4F au niveau de la coiffe et réprime l'initiation de la traduction coiffe-dépendante des messagers cellulaires mais n'affecte pas la traduction des messagers des picornavirus, qui utilisent l'initiation IRES-dépendante.

### 1.7.2 Phosphorylation du facteur eIF2

La formation du complexe ternaire dépend de l'état d'une sous-unité du facteur d'initiation eIF2, eIF2 $\alpha$ . Le complexe ternaire (eIF2•GTP•Met-ARNT<sup>Met</sup>) amène l'ARNT chargé de méthionine au codon initiateur. Après la reconnaissance du codon, il y a hydrolyse du GTP lié à eIF2 et libération de eIF2-GDP. Le facteur eIF2B, qui échange le GDP pour un GTP, forme alors eIF2-GTP prêt à former un nouveau complexe ternaire et à participer à nouveau à l'initiation de la traduction. Lorsqu'il y a un stress cellulaire, des kinases phosphorylent la sous-unité  $\alpha$  de eIF2, ce qui empêche eIF2B d'exercer son activité d'échangeur de GTP. Par conséquent, la synthèse globale des protéines est réprimée [166,167]. Par exemple, on connaît la kinase PERK



qui phosphoryle eIF2 $\alpha$  en condition du stress du réticulum endoplasmique et qui réduit la traduction globale [168].

Puisque eIF2 participe à la formation du complexe ternaire et, par conséquent, au recrutement de l'ARNt chargé de méthionine au codon initiateur, sa phosphorylation pourrait en principe affecter également les IRES viraux et cellulaires. Cependant, des études ont rapporté que l'activité des IRES des messagers viraux et cellulaires [146,169-173] n'est pas inhibée par la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ . D'autres facteurs sont utilisés pour remplacer eIF2 en conditions de stress cellulaire, bien que le mécanisme ne soit pas encore caractérisé. Un exemple est le facteur eIF5B, orthologue du facteur IF2 chez les procaryotes, connu pour recruter le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> au ribosome, mais qui contribue à l'association de deux sous-unités ribosomiques au niveau du codon initiateur [174]. Deux études ont montré que eIF5B est utilisé à la place de eIF2 pour initier la traduction interne chez les virus PPC et VHC, appartenant à la même famille et ayant une structure similaire [169,170]. Un autre exemple connu est la ligatine et/ou la combinaison de protéines MCT-1/DENR qui permettent le recrutement de Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> au codon initiateur chez les IRES partageant des motifs semblables à celui de VHC [175,176]. Quant au virus CrPV, les éléments de structure secondaire de son IRES permettent d'accomplir les fonctions de tous les facteurs canoniques nécessaires à l'initiation de la traduction. L'IRES du CrPV est d'ailleurs un cas particulier car le positionnement de l'un de ses domaines dans le site P du ribosome ne requiert pas le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> et l'initiation de la traduction via l'IRES du CrPV ne se fait pas au niveau d'un AUG [177].

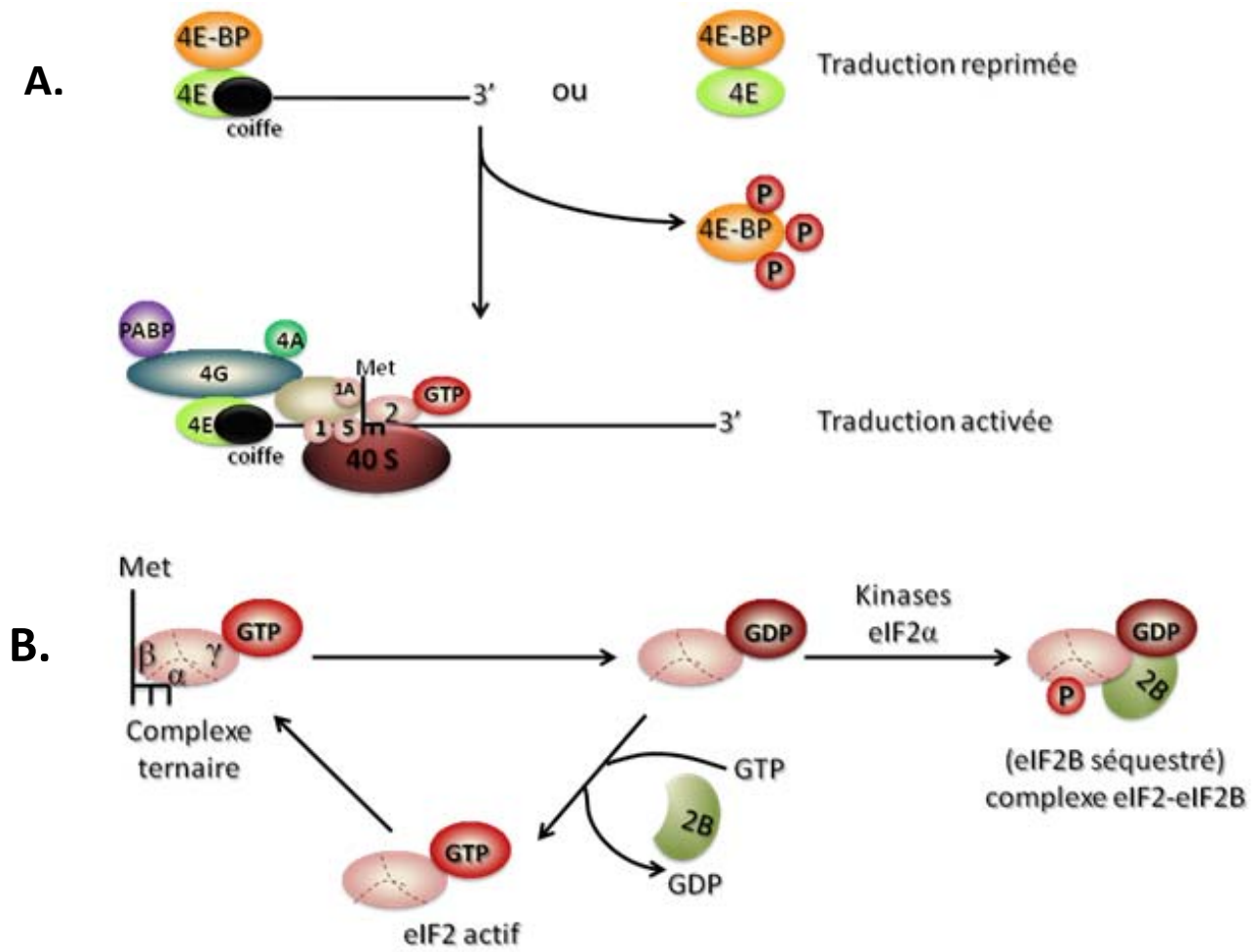
Par ailleurs, une étude rapporte que la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  induite par le stress du réticulum endoplasmique ou par la présence d'ARN double-brin étranger dans la cellule (ex : infection virale) peut également favoriser l'activité de certains IRES cellulaires ou viraux, tel que montré chez le messenger cellulaire codant pour la protéine cat-1 (transporteur d'acides aminés cationiques de type 1) et le messenger viral du CrPV [178]. Un mécanisme possible selon lequel la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  stimule indirectement l'activité d'un IRES, serait par l'induction d'une protéine nécessaire à l'activité de l'IRES en question. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par une étude chez le messenger de cat-1 montrant que la phosphorylation de eIF2

**Figure 1-3. Mécanismes de contrôle de la traduction en conditions de stress cellulaire.**

Figure adaptée d'après F. Gebauer et M. W. Hentze [119].

**A.** Induction des répresseurs 4E-BP. Les 4E-BP sont des protéines liant le facteur eIF4E (4E) à l'état d'hypo-phosphorylation, soit en conditions de stress cellulaire. Cette interaction empêche la liaison de eIF4E à la coiffe et à eIF4G (4G), inhibant ainsi la traduction coiffe-dépendante. En présence de signaux de croissance cellulaire, les 4E-BP sont phosphorylés et libérés du complexe avec eIF4E. Le facteur eIF4E peut interagir alors avec la coiffe et avec eIF4G permettant ainsi l'initiation de la traduction.

**B.** Conséquences de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ . Le facteur eIF2 est constitué de 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et il fait partie du complexe ternaire eIF2•GTP•Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Lors d'un stress cellulaire, des kinases sont induites et phosphorylent la sous-unité  $\alpha$  du facteur eIF2 lié au GDP [179,180]. Cette phosphorylation empêche la dissociation entre eIF2 et eIF2B et, comme eIF2B est présent en très faible quantité, elle inhibe une future réaction d'échange de GTP pour GDP. La traduction globale des ARNm est ainsi réprimée.



induit la synthèse d'un facteur nécessaire à la traduction de cat-1 via une initiation interne [181].

### **1.7.3 Clivage des facteurs canoniques d'initiation**

Outre les mécanismes d'activation des 4E-BP et de phosphorylation de eIF2 $\alpha$  qui inhibent la traduction coiffe-dépendante, certains virus utilisant un IRES codent pour des protéases qui clivent des facteurs canoniques d'initiation (eIF4G, PABP) [182,183]. Par conséquent, la traduction coiffe-dépendante est réprimée, sans affecter par contre la traduction des ARNm viraux qui n'utilisent pas la coiffe.

## 1.8 L'hypothèse de l'existence d'IRES chez l'ARNm de p53

Deux groupes de chercheurs ont identifié durant la même année une/deux région(s) IRES dans l'ARNm de p53. Le groupe de Yang [56] a identifié un IRES dans la région 5'UTR du messenger de p53 qui régule la traduction de ce dernier en réponse aux dommages à l'ADN causés par l'étoposide. Le groupe de Das [57] a identifié deux régions IRES dans l'ARNm de p53. Un des IRES identifiés se trouve dans la région 5'UTR (que nous nommons IRES1), tout comme pour le groupe de Yang, et il contrôle la synthèse de la protéine p53 pleine-longueur, tandis que le second IRES se trouve dans la région codante (premiers 120 nucléotides; nous le nommons IRES2) et il génère un isoforme dépourvu des 40 premiers acides aminés du domaine N-terminal de p53. Cet isoforme est nommé  $\Delta$ Np53. De plus, l'activité de deux IRES identifiés par le groupe de Das est dépendante du cycle cellulaire : l'IRES de la région 5'UTR étant activé en phase G2, tandis que l'IRES de la région codante devient actif en phase G1-S du cycle cellulaire. La figure 1-4 présente les deux IRES de p53 sur la structure secondaire de l'ARNm de p53 déterminée par la technique de SHAPE (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) [184].

Récemment, le groupe de Ruggero [185] a montré qu'il y aurait une transition de la traduction coiffe-dépendante vers la traduction IRES-dépendante contrôlant l'expression de p53 durant la sénescence induite par l'oncogène Ras dans des fibroblastes de souris. Cependant, il faut noter que l'activité de l'IRES de p53 observée dans ces conditions de sénescence est très faible et pourrait difficilement être responsable d'une augmentation des niveaux de p53 observés dans la sénescence [47].

Plusieurs protéines sont connues dans la littérature pour agir sur la région 5'UTR du messenger de p53 et influencer la synthèse de p53. Parmi ces protéines, nous pouvons citer p53, la protéine ribosomique L26, la nucléoline, PTB (polypyrimidine tract binding protein) et Mdm2 [110,186-188]. Ces protéines détruisent ou maintiennent la stabilité des structures en 5'UTR, ce qui favorise ou inhibe la synthèse de p53. Notons que l'action de Mdm2 qui stimule la traduction de p53 diffère de son action classique comme ubiquitine ligase conduisant à la dégradation de p53. La stimulation de la traduction du messenger de p53 par Mdm2 est

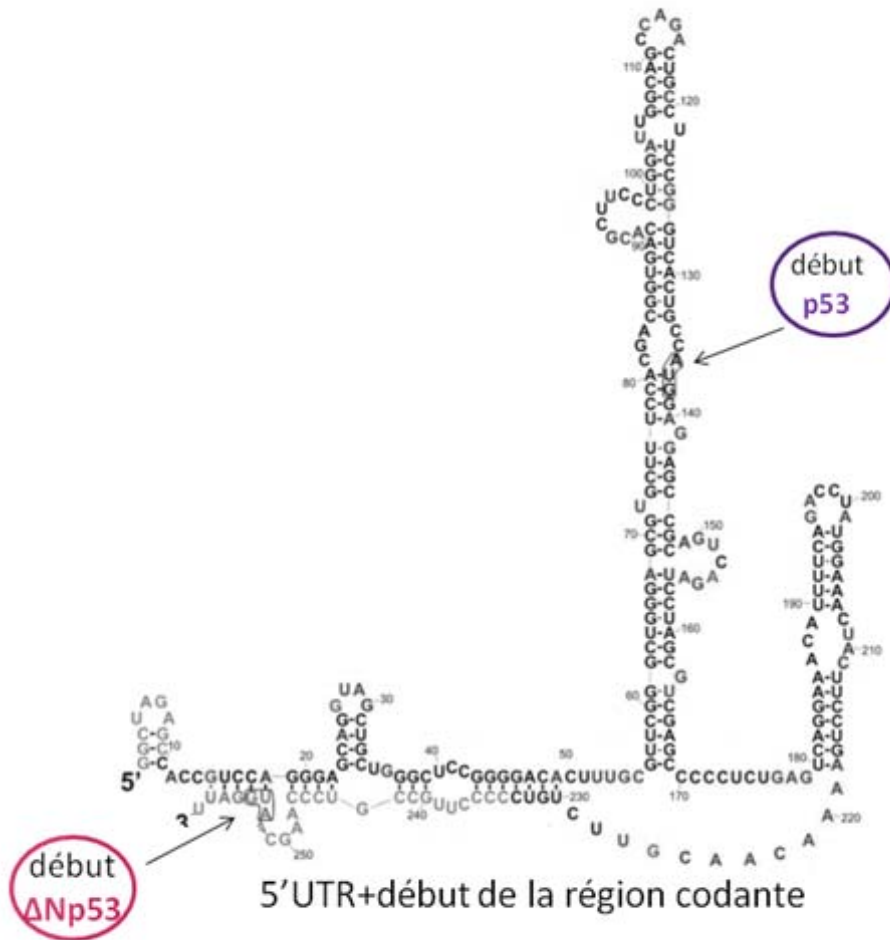
observée dans diverses conditions de stress qui répriment l'activité ubiquitine ligase de Mdm2 [187]. Quant à la protéine ribosomique L26, la stimulation de la traduction de p53 est favorisée par la formation d'une hélice suite à l'interaction entre les régions 5'-3' UTR [189]. Certaines des protéines interagissant avec le 5'UTR de l'ARNm de p53 telles la nucléoline et des protéines ribosomiques interagissent avec des structures IRES des messagers viraux et agissent comme ITAF [190,191]. Cela suggère que ces protéines pourraient réguler les régions IRES de p53 également.

**Figure 1-4. Localisation et structure des régions IRES de l'ARNm de p53.**

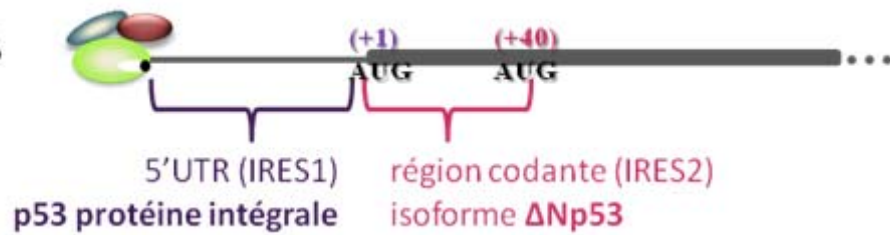
**A.** Structure secondaire de la région en 5' de l'ARNm de p53 résolue par la technique de SHAPE. Les codons d'initiation sont indiqués par une flèche et la protéine produite est indiquée en couleur : mauve pour l'AUG(+1), responsable de la synthèse de p53, et rose pour l'AUG (+40), responsable de la production de l'isoforme  $\Delta$ Np53. Adaptée d'après Blaszczyk et Ciesiolka [184].

**B.** Localisation des IRES de p53 selon le groupe de Das [57]. L'IRES1 est localisé dans la région 5'UTR du messenger de p53 et les ribosomes initient au codon initiateur (+1). L'IRES2 s'étend sur les premiers 40 codons de la région codante du messenger de p53 et les ribosomes initient au codon initiateur (+40).

A.



B. ARNm de p53





## 1.9 p53 et son isoforme $\Delta$ Np53

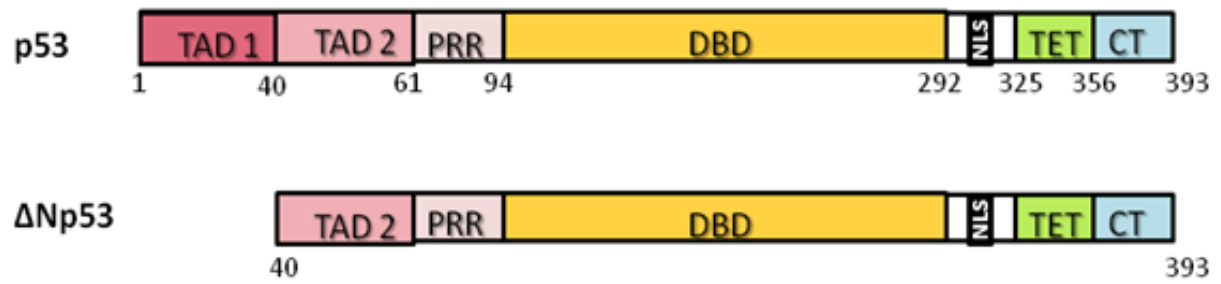
p53 oligomérisé et se trouve sous la forme de tétramère dans la cellule. L'un des isoformes le plus étudié est l'isoforme  $\Delta$ Np53 qui est dépourvu du domaine N-terminal où se trouve le premier domaine de transactivation de p53 (1-40 aa (acides aminés)) et le site d'interaction avec Mdm2 (17-23 aa)[192]. Cependant,  $\Delta$ Np53 possède encore le deuxième domaine de transactivation (43-63 aa)[193,194] ainsi que le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'oligomérisation C-terminal (figure 1-5). Cet isoforme permet la formation des complexes tétramères de p53 ayant une composition différente de p53 pleine-longueur. Les complexes contenant un niveau élevé de l'isoforme  $\Delta$ Np53 sont plus résistants à la dégradation par Mdm2 et cela influence l'expression des gènes induits par p53 [195].

Basé sur des observations selon lesquelles la production d'ARNm de p53 atteint un pic en phase G1-S, tandis que le niveau maximal de protéine p53 est atteint au milieu de la phase S, le groupe de Das [57] suggère que le rapport p53/ $\Delta$ Np53 pourrait être un facteur essentiel pour la régulation de la traduction de p53 et pour l'entrée en phase G2-M du cycle cellulaire. Les auteurs proposent un modèle selon lequel la production de l'isoforme  $\Delta$ Np53 en phase G1-S empêche l'interaction de p53 avec le 5'UTR de son ARNm et donc cela permet la production p53 pleine-longueur au milieu de la phase S jusqu'à un certain niveau quand p53 arrive à interagir avec le 5'UTR et inhiber sa propre traduction, ce qui permet l'entrée en phase G2-M.

Selon d'autres études, la surexpression de  $\Delta$ Np53 dans des cellules dépourvues de p53 peut induire l'apoptose, ce qui signifie que cet isoforme peut agir indépendamment ou de concert avec p53 pleine longueur pour promouvoir différentes réponses cellulaires face aux stress [195]. Également, une autre étude a montré que la surexpression de  $\Delta$ Np53 dans des souris transgéniques conduit à la sénescence cellulaire et au vieillissement prématuré [21]. Notons que le niveau d'expression de  $\Delta$ Np53 observé varie dans les différentes lignées cancéreuses étudiées [196]. Toutes ces études nous conduisent à croire que l'expression des deux isoformes de p53 à différents niveaux serait un facteur important dans la décision cellulaire différenciée et spécifique face aux différents stress.

**Figure 1-5. Représentation des domaines de p53 et de son isoforme  $\Delta$ Np53.**

Adapté d'après Joerger et Fersht [197] et Chiang et al. [198]. Les différents domaines de p53 et de  $\Delta$ Np53 sont indiqués en couleur et portent chacun un nom : les domaines de transactivation 1 et 2 (TAD1 et TAD2), la région riche en proline (PRR), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le signal de localisation au noyau (NLS) (305-322), le domaine de tétramérisation (TET) et le domaine C-terminal (CT). L'isoforme  $\Delta$ Np53 ne possède pas le premier domaine de transactivation TAD1 qui contient le site d'interaction avec Mdm2 (17-23 aa)[192].



## **1.10 Étude de l'activité des IRES de l'ARNm de p53**

### **1.10.1 Hypothèse**

En conditions de stress cellulaire, tel que le stress oxydatif dans la sénescence, on assiste à une répression de la traduction globale de protéines, due à une diminution de la traduction coiffe-dépendante [111]. Étant donné qu'une grande partie du métabolisme cellulaire est concentrée sur la synthèse globale de protéines, une régulation générale à ce niveau est requise pour limiter une dépense d'énergie inutile et pour favoriser des réponses spécifiques indispensables au rétablissement du bon fonctionnement de la cellule. Tout dépendamment de la sévérité des dommages engendrés par les stress cellulaires, des réponses seront mises en place pour activer la synthèse de facteurs spécifiques nécessaires pour diminuer le stress et rétablir les conditions physiologiques cellulaires normales ou bien pour entraîner la sénescence cellulaire ou l'apoptose [115].

Notre étude porte sur la traduction de p53 dans la sénescence qui est accompagnée d'un stress cellulaire oxydatif. En conditions de répression de la traduction coiffe-dépendante, la traduction de p53 via un/des IRES deviendrait alors importante pour assurer la réparation et la survie des cellules endommagées ou bien la mort cellulaire. Une seule étude (mentionnée plus haut, section 1.8) a montré jusqu'à maintenant que l'IRES1 de l'ARNm de p53 serait activé dans la sénescence induite par l'oncogène Ras [185]. Notre hypothèse est que les deux IRES du messenger de p53, tel que décrit par le groupe de Das [57], sont activés dans la sénescence.

### 1.10.2 But de notre étude

Le but général de cette étude est d'identifier les éléments-clés qui contrôlent l'activité des deux IRES du messenger de p53 et d'étudier leur comportement dans le modèle de sénescence répllicative et de sénescence induite par l'oncogène Ras.

Dans un premier temps, qui fait l'objet de ce mémoire, nous avons construit et mis au point le système nécessaire pour étudier les IRES de p53. Par la suite, nous avons analysé l'intégrité des vecteurs et l'activité des IRES dans les cellules transformées HEK293T. Ensuite, nous voulions analyser l'activité des IRES de l'ARNm de p53 dans la sénescence répllicative et celle induite par l'oncogène Ras dans des fibroblastes primaires humains.

### 1.10.3 La méthode du vecteur bicistronique comme système d'étude

La méthode largement utilisée dans la littérature pour l'étude des IRES est le vecteur bicistronique qui contient la région IRES d'intérêt entre deux gènes rapporteurs [129]. Les rapporteurs choisis sont des gènes qui peuvent être facilement quantifiés tels que les gènes des luciférases (*Renilla*, luciole). L'initiation de la traduction du premier gène rapporteur dépend de la coiffe (coiffe-dépendante) tandis que l'expression du deuxième gène rapporteur dépend de l'IRES de la région intercistronique (IRES-dépendante). Des vecteurs contrôles sont utilisés pour établir le bruit de fond, tel qu'un vecteur vide et un vecteur contenant une séquence *linker* sans activité IRES dans la région intercistronique. Pour prévenir la translecture, c'est-à-dire, lecture par le ribosome d'un codon de terminaison du premier gène comme un codon sens, des codons de terminaison additionnels sont ajoutés. Également, une région très structurée telle que l'IRES inactivé du virus EMCV, nommée  $\Delta$ EMCV, peut être ajoutée dans la région intercistronique précédant l'IRES d'intérêt ou bien en 5' de l'ARNm précédant le premier gène rapporteur du vecteur bicistronique afin de bloquer toute interférence de la traduction coiffe-dépendante avec l'expression du second gène rapporteur [199].

Pour étudier les IRES de p53, nous avons construit par clonage plusieurs vecteurs bicistroniques à deux luciférases contenant le gène de la *Renilla* (Rluc), le gène de la luciole (Fluc) et une des régions IRES d'intérêt du messenger de p53 dans la région intercistronique : le

5'UTR (IRES1), le début de la région codante entre les codons 1 et 40 (IRES2), la région 5'UTR+codons 1-40 (IRES\*) et les mutants au codon AUG(+40) (IRES\*1) ou AUG(+1) (IRES\*2). L'initiation de la traduction de la Rluc dépend de la coiffe tandis que celle de la Fluc dépend de l'IRES de la région intercistronique. L'activité de l'IRES est évaluée par le rapport entre les activités luciférases : Fluc/Rluc. Comme contrôle négatif, nous avons cloné les séquences complémentaires de l'IRES1 et de l'IRES2 (SERI1 et SERI2) entre les deux gènes luciférases rapporteurs. Un contrôle négatif supplémentaire a été réalisé en clonant la séquence  $\Delta$ EMCV dans la région intercistronique. Pour confirmer l'absence d'interférence de la traduction coiffe-dépendante sur la traduction du deuxième cistron, nous avons ajouté, dans un deuxième temps, la structure  $\Delta$ EMCV en amont de la région IRES ou bien en 5' de l'ARN messager, proche de la coiffe.

Contrairement aux données de la littérature, nous n'avons pas observé d'activité IRES dans l'ARNm de p53 dans des cellules HEK293T ou dans des fibroblastes primaires sénescents. Nous avons alors révisé systématiquement les données concernant les IRES cellulaires et découvert que l'existence de la plupart des IRES cellulaires des organismes vertébrés est contestée. Nous avons également constaté l'existence d'un autre mécanisme d'initiation de la traduction qui est coiffe-indépendant, mais qui requiert toutefois l'extrémité 5' du messager (voir Discussion).

## Chapitre II : Méthodologie

### 2.1 Construction des rapporteurs luciférases

**pDual-IRES-p53.** Pour étudier l'activité des IRES de l'ARNm de p53, des vecteurs bicistroniques pDual-IRES-p53 ont été construits à partir du vecteur rapporteur à deux luciférases pDual-HIV(-1) [200] codant pour les gènes luciférases de la *Renilla* (Rluc) et de la luciole (Fluc), séparés par la région de changement de cadre de lecture du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Différentes régions d'intérêt du messager de p53 ont été clonées entre les séquences de Rluc et de Fluc, telles que la région 5'UTR (IRES1), les premiers 120 nucléotides de la séquence codant pour p53 (codons 1-40; IRES2) ou bien le 5'UTR+début région codante (IRES\*), dans les sites de restriction des enzymes *KpnI* et *BamHI*. Également, des vecteurs contrôles ont été réalisés (SERI1 et SERI2) en clonant les séquences complémentaires des IRES de p53 en sens inverse entre Rluc et Fluc. En plus des régions IRES d'intérêt ou des régions contrôle, toutes les constructions bicistroniques contiennent également : trois codons de terminaison précédant l'IRES, afin de permettre une terminaison efficace de la traduction du premier cistron Rluc, un codon initiateur AUG en aval de l'IRES et les 30 nucléotides suivants, pour préserver le contexte du codon initiateur et l'intégrité de l'IRES, ainsi qu'une séquence *linker* de 30 nucléotides (codant pour GGGGSGGGGS) qui sépare la région intercistronique de la séquence de Fluc, empêchant l'interférence de la région intercistronique avec le repliement de Fluc. La transcription des gènes luciférases est sous le contrôle du promoteur CMV qui génère un ARNm bicistronique.

Pour la construction du vecteur pDual-IRES1-p53, un brin synthétique (BioCorp) a été utilisé, contenant la séquence du 5'UTR de l'ARNm de p53 chez l'humain, trouvée dans la base de données *GenBank* (AY627884). Le fragment a été amplifié en deux étapes utilisant les amorces **A** et **B** (étape 1) et **C** et **D** (étape 2) (voir Tableau I).

Pour la construction du vecteur pDual-IRES2-p53, la région entre les codons 1-40 a été amplifiée à partir du vecteur pLPC\_hp53 [201] en utilisant les amorces **E** et **F** (étape 1) et **G** et **H** (étape 2).

Pour la construction du vecteur pDual-SERI1-p53 (SERI2), contenant la région 5'UTR (ou les codons 1-40) complémentaire inversée du messenger de p53, un brin synthétique (BioCorp) a été amplifié en utilisant les amorces suivantes : **I** et **B** (étape 1) et **J** et **D** (étape 2) pour SERI1; **K** et **F** (étape 1) et **L** et **H** (étape 2) pour SERI2.

Pour la construction du vecteur pDual-IRES\*-p53, contenant la région 5'UTR et le début de la région codante du messenger de p53, un brin synthétique (BioCorp) a été amplifié en deux étapes en utilisant les amorces suivantes : **A** et **F** (étape 1) et **C** et **H** (étape 2).

Pour la construction des mutants du vecteur pDual-IRES\*-p53, soit le pDual-IRES\*1 et le pDual-IRES\*2, des mutations ponctuelles dirigées (T2A et T119A) ont été effectuées afin de changer les codons initiateurs ATG en AAG, à l'aide de la technique de PCR à 4 oligonucléotides [202] en utilisant les amorces suivantes : **M/H** et **C/N** pour pDual-IRES\*1-p53; **O/H** et **C/P** pour pDual-IRES\*2-p53.

Dans chaque cas, les fragments obtenus ont été hybridés à une température de 68°C pendant 3 min. Par la suite, le fragment a été complété par la polymérase Phusion en ajoutant les amorces externes **C** et **H**, 15 min à 72°C. L'amplification du fragment s'est poursuivie par la réaction habituelle de PCR.

**pDual-ΔE-IRES-p53 et pDual-ΔEMCV(CTL).** Pour la construction du contrôle négatif pDual-ΔEMCV(CTL), l'IRES inactivé du virus EMCV (nommé ΔEMCV)[199] a été cloné en deux étapes dans le rapporteur à deux luciférases pDual-HIV(-1). Dans un premier temps, le fragment ΔEMCV a été amplifié à partir du vecteur pRΔEF [199] en utilisant les amorces **Q** et **R**. Le fragment obtenu a été cloné dans le vecteur pDual-HIV(-1) dans les sites des enzymes *KpnI* et *BamHI*. Dans un deuxième temps, le fragment contenant la séquence *linker* a été amplifié à partir du vecteur pDual-IRES1Δ30-p53 (soit le pDual-IRES1-p53 manquant les 30 nucléotides après le codon initiateur, réalisé au laboratoire) avec les amorces **S** et **T** et cloné dans le vecteur de l'étape 1 entre les sites de *BamHI/BglII* et *PfI23II*.

**pDual-5'ΔE-ΔE-IRES-p53.** Pour vérifier l'activité des régions IRES du messenger de p53 en absence de traduction de Rluc, la région structurée ΔEMCV a été ajoutée en 5' de la séquence codant pour la luciférase Rluc. Plus précisément, la région ΔEMCV a été amplifiée à partir du



vecteur pDual- $\Delta$ EMCV(CTL) avec les amorces **U** et **V** et clonée dans les vecteurs pDual- $\Delta$ E-IRES-p53 (IRES1 et 2) ainsi que dans les vecteurs contrôles négatifs contenant les régions SERI1 et 2, dans le site de restriction de *HindIII*.

**Vecteur Fluc-Coiffe Dépendante (Fluc-CDep).** Pour la construction du vecteur exprimant la luciférase Fluc via une initiation coiffe-dépendante (Fluc-CDep), le site de *BamHI* a été rajouté par la technique de PCR à 4 oligonucléotides dans le vecteur pDual-HIV(0)[200] en amont de la séquence codant pour la luciférase Rluc, avec les amorces **X/Y** et **Z/W**. Plus précisément, le fragment final amplifié a été cloné dans les sites de *SnaBI* et *BsaBI*. Ensuite, la séquence de Rluc a été éliminée par digestion du vecteur résultant avec l'enzyme *BamHI*. La ligation du vecteur restant sur lui-même a permis l'obtention du rapporteur monocistronique Fluc-CDep permettant l'expression de Fluc de manière coiffe-dépendante.

**Vecteur dépourvu de promoteur, pDual- $\Delta$ CMV-IRES\*-p53.** Pour vérifier l'absence de promoteur cryptique dans la région 5'UTR et au début de la région codante, le promoteur CMV a été éliminé du vecteur pDual-IRES\*-p53. Dans un premier temps le site de *SpeI* a été ajouté à la fin de la séquence de CMV à l'aide de la technique de PCR à 4 oligonucléotides avec les amorces **A'/B'** et **C'/D'**. Par la suite, le vecteur a été digéré avec *SpeI* et reliqué sur lui-même.

**Vecteurs rétroviraux pMSCV-( $\Delta$ E)-IRES-p53.** Pour étudier l'activité des IRES de l'ARNm de p53 dans la sénescence, la cassette Rluc-IRES-Fluc a été préalablement clonée dans le vecteur rétroviral pMSCV-hygro (Clontech), un système d'expression optimisé pour étudier des gènes dans les cellules souches humaines ou murines, mais également dans la plupart des cellules de mammifères. Le vecteur pMSCV contient entre autre une séquence *linker* ayant plusieurs sites de restriction ainsi qu'un gène de résistance à l'hygromycine. Dans un premier temps, nous avons effectué la ligation de la cassette Rluc-IRES-Fluc, obtenue par la digestion des vecteurs bicistroniques pDual avec *HindIII*, traitement au Klenow (NEB) et digestion à nouveau avec *XhoI*, avec le vecteur pMSCV préalablement digéré avec *SnaBI* et *XhoI*. Les vecteurs obtenus lors de cette première étape ont été nommés pMSCV-IRES-p53 où l'IRES est soit l'IRES1, l'IRES2, SERI1 ou SERI2.

Pour la construction des rapporteurs rétroviraux pMSCV- $\Delta$ E-IRES-p53, nous avons cloné le fragment issu de la digestion des différents vecteurs pDual- $\Delta$ E-IRES avec *Bsa*BI et *Pfl*23II dans le vecteur pMSCV-IRES1-p53 préalablement digéré avec ces mêmes enzymes.

## 2.2 Culture et transfection des cellules HEK293T

L'activité des IRES de p53 a été d'abord étudiée dans les cellules en culture HEK293T, lignée de cellules immortalisées dérivant des cellules rénales embryonnaires humaines et exprimant de manière stable l'antigène T du virus simien SV40. Les cellules HEK293T ont été maintenues dans un milieu synthétique (Dulbecco's modified Eagle medium) (DMEM; Gibco) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS; Wisent) et avec les antibiotiques pénicilline /streptomycine sulfate 1% (Wisent) à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules HEK293T ont été cultivées dans des plaques de 6 puits (3x10<sup>5</sup> cellules/puits) dans 3 mL de DMEM complet et transfectées 24 heures plus tard, à 75-80% de confluence, avec l'une des constructions bicistroniques (1ug/puits) en utilisant l'agent de transfection transitoire polyéthylèneimine (PEI; Polysciences, Inc). Pour transfecter, 3ug de PEI a été utilisé par ug d'ADN transfecté. Un mélange de PEI/DMEM incomplet ( $V_{\text{final}}$  de 83uL/transfection) et d'ADN/DMEM (1ug ADN/transfection;  $V_{\text{final}}$  de 83uL/transfection) ont été réalisés préalablement à la transfection. Après 5 min d'incubation à la température de la pièce, les deux solutions ont été combinées. Après au moins 15 min d'incubation à température de la pièce, le complexe PEI/ADN a été déposé uniformément dans les puits contenant les cellules HEK293T. Les cellules ont été récoltées 48 heures post-transfection, lavées à la solution saline PBS pour éliminer les cellules mortes et les débris, puis lysées dans 250  $\mu$ L de tampon de lyse (Promega). Les lysats ont été par la suite conservés à -80° C jusqu'à leur utilisation.

## 2.3 Infection des fibroblastes IMR90

La méthode d'infection des fibroblastes primaires humains IMR90 (ATCC, USA) est constituée de plusieurs étapes. Dans un premier temps, des cellules Phoenix-amphotropiques (Phoenix<sub>a</sub>; ATCC, USA) programmées de produire les protéines nécessaires pour l'assemblage et la production des virus sont cultivées dans une plaque de 10 cm (4-5x10<sup>6</sup>cellules/plaque, 9 mL

DMEM complet). 12 heures plus tard, les Phoenix<sub>a</sub> sont co-transfectées par la méthode standard au calcium phosphate [203] avec l'un des différents vecteurs rétroviraux pMSCV-IRES décrits plus tôt (20 ug/transfection) et le vecteur contenant la séquence signal d'assemblage du virus (10 ug/transfection). 12 heures post-transfection, une solution de sodium butyrate est rajoutée (10 mM final) pour favoriser l'expression des gènes viraux. 12 heures plus tard, le milieu des cellules Phoenix<sub>a</sub> est changé. 12-16 heures après, ce même milieu contient les virus exprimant la cassette Rluc-IRES-Fluc et le gène de résistance (hygromycine). Il est d'abord filtré (filtre 0.45 µm) et ensuite transféré sur les fibroblastes en culture IMR90 cultivés la veille de l'infection (8x10<sup>5</sup> cellules/plaque 10 cm). 4 µg de polybrène/mL de milieu sont rajoutés à la fois sur les fibroblastes pour favoriser l'infection. Cette étape est effectuée 3 fois en 24 heures afin de maximiser l'efficacité d'infection des fibroblastes. Une plaque de Phoenix<sub>a</sub> a été utilisée par plaque d'IMR90. Les IMR90 infectés ont été sélectionnés avec 100 µg/mL de hygromycine pour environ 5 jours, 12-16 heures après la dernière infection. Des contrôles de sélection à l'hygromycine ont été réalisés concomitamment afin de suivre la sélection. L'état de sénescence cellulaire répliquative a été vérifié au microscope, selon la morphologie aplatie et large des cellules sénescentes. Les IMR90 ont été récoltés tout de suite après la fin de la sélection (IMR 90 jeunes)/lorsqu'ils avaient un phénotype sénescence (sénescence répliquative ou induite avec Ras), lavées au PBS et récoltés dans 100 µL de tampon de lyse PLB/plaque de 10 cm. Les lysats cellulaires ont été gardés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## **2.4 Sénescence induite par l'oncogène Ras dans les IMR90**

Pour étudier l'activité des IRES du messager de p53 dans la sénescence induite par l'oncogène Ras, des plaques individuelles de cellules Phoenix<sub>a</sub> ont été transfectées tel que décrit précédemment avec les vecteurs rétroviraux pMSCV-IRES ou bien avec le vecteur pBabe-Ras [47] ou les vecteurs vides correspondants. Lors de l'étape d'infection des IMR90 par les virus produits par les cellules Phoenix<sub>a</sub>, nous avons transféré sur les IMR90 le milieu d'une plaque de Phoenix<sub>a</sub>, transfectée avec l'un des vecteurs pMSCV-IRES, ainsi que le milieu d'une plaque transfectée avec pBabe-Ras ou le vecteur vide. Les fibroblastes ont été sélectionnés

avec l'hygromycine (100 µg/mL, ~5 jours) et la puromycine (2,5 µg/mL, ~3 jours) et récoltés tel que décrit plus haut.

## 2.5 Mesure des activités luciférases

Pour la mesure des activités luciférases, les échantillons de cellules HEK293T ou IMR90 ont été décongelés et ensuite centrifugés 3 min afin de précipiter les débris cellulaires. L'expression des luciférases a été mesurée à l'aide du luminomètre de marque Hidex Triathler™. L'activité luciférase a été mesurée avec l'ensemble commercial *Dual-Luciferase Assay System* (Promega) dans les IMR90 selon les instructions du manufacturier. Par contre, les mesures des activités luciférases dans les HEK293T ont été prises avec un agent préparé au laboratoire. 50 µL d'une solution contenant le substrat de Fluc sont ajoutés à trois quantités différentes de lysat de HEK293T, suivi de l'ajout d'une seconde solution qui éteint la lumière émise par Fluc et qui contient le substrat de Rluc. La solution mesurant l'activité Fluc contient 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 30 mM Tricine pH 7.8, 0.1 mM D-luciférine (Nanolight Technologies), 0.1 mM coenzymeA (Nanolight Technologies) et 3 mM ATP, tandis que la solution mesurant l'activité Rluc contient 1.1 M NaCl, 2.2 mM EDTA, 0.22 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 5.1, 0.44 mg/mL BSA, 1.3 mM NaN<sub>3</sub> et 1.43 µM coelenterazine (Nanolight Technologies) (1 mg dissous dans 1 mL 100% ETOH anhydre, 2.45 mM final). Les valeurs obtenues à l'aide du luminomètre représentent des comptes d'émissions photoniques qui sont proportionnels à la quantité de chaque luciférase présente dans le lysat. L'activité IRES est calculée par le rapport Fluc/Rluc où Fluc est produite via l'IRES de la région intercistronique tandis que Rluc est traduite via le mécanisme coiffe-dépendant. Par ailleurs, les rapports Fluc/Rluc obtenus en présence des vecteurs pDual-ΔEMCV(CTL), pDual-SER11-p53 ou pDual-SER12-p53 ont servi de contrôles, dépendamment des expériences, et ont été fixés arbitrairement à 1. Les mesures des activités luciférases ont été effectuées à partir de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata. Les valeurs obtenues pour les différentes expériences ont été traitées avec le logiciel GraphPad Prism version 4.00 (Windows) pour calculer la moyenne, l'erreur standard et pour effectuer les tests statistiques, considérant significative une valeur *p* plus petite que 0.05.

Tableau 1: Noms et séquences des amorces utilisées dans cette étude

| Nom de l'amorce | Séquence (5'--->3')   |
|-----------------|---|
| A               | 5'GCTAGGTACCCACCAGATCTTAGTCTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC- 3'          |
| B               | 5'CGTTGGATCCCGCTTCCGCCTCCGCCCTCGACGCTAGGATCTGACTGACTGCGGC- 3' |
| C               | 5'GCTAGGTACCCTAGGGTCTCTCTTAGACCAGATCTTAGTCTAGAGCCACCG- 3'     |
| D               | 5'CGTTGGATCCCGCTTCCGCCTCCGCCGCTTCCGCCTCCGCCCTCGACGC- 3'       |
| E               | 5'GCTAGGTACCCACCAGATCTTAGGAGGAGCCGCGAGTCAGATCCTAGC-3'         |
| F               | 5'CGTTGGATCCCGCTTCCGCCTCCGCCAATATCGTCCGGGGACAGCATCAAA-3'      |
| G               | 5'GCTAGGTACCCTAGGGTCTCTCTTAGACCAGATCTTAGGAGGAGCCGCGAGTC-3'    |
| H               | 5'CGTTGGATCCCGCTTCCGCCTCCGCCGCTTCCGCCTCCGCCAATATCGTCCG- 3'    |
| I               | 5'GCTAGGTACCcACCAGATCTTAGGGCAGTGACCCGGAAGGCAGTCT- 3'          |
| J               | 5'GCTAGGTACCcTAGGGTCTCTCTTAGACCAGATCTTAGGGCAGTGACCCGG- 3'     |
| K               | 5'GCTAGGTACCCACCAGATCTTAGTGCTTGGGACGGCAAGGGGGACA- 3'          |
| L               | 5'GCTAGGTACCCTAGGGTCTCTCTTAGACCAGATCTTAGTGCTTGGGACGGC- 3'     |
| M               | 5'CCTTGCCGTCCCAAGCAaagGATGATTTGATGCTGTCC-3'                   |
| N               | 5'GGACAGCATCAAATCATCcttTGCTTGGGACGGCAAGG-3'                   |
| O               | 5'GCCTCCGGGTCCTGCCaagGAGGAGCCGCGAGTCAGATCC-3'                 |
| P               | 5'GGATCTGACTGCGGCTCCTCcttGGCAGTGACCCGGAAGGC-3'                |
| Q               | 5'GAACAATAATTTCTAGGTACCCTAGGCCCCCCCTAACG-3'                   |
| R               | 5'GGCGTCTCCATGGATCCGGGGTGGCTGAATTCGTGTTTTTCAAAGG-3'           |
| S               | 5'GCCAGACTGCCTTCCGGGTGAGATCTATGGGCGGAGGCGGAAGCG-3'            |
| T               | 5'CGGACATTTGAAGTATTCCGCGTACGTGATGTTACCTCG-3'                  |
| U               | 5'GCTGAAGAACGAGCAGGGaagCTTCTAGCCCCCCCCCTAACG-3'               |
| V               | 5'GCTTCCGCCTCCGCCCATaagCTTGGGGTGGCTGAATTCGTGTTTTTCAAAGG-3'    |

|           |   |
|-----------|---|
| <b>X</b>  | 5'GCTAGAGCCACCATGAGGATCCAGGTGTACGACCCCGAGC-3'               |
| <b>Y</b>  | 5'GGGGTCGCTCTCGATGAACATCTTGGGCAGGTCGTCGCTGGC-3'             |
| <b>Z</b>  | 5'GGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTG-3'   |
| <b>W</b>  | 5'GCTCGGGGTCGTACACCTGGATCCTCATGGTGGCTCTAGC-3                |
| <b>A'</b> | 5'GGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATG-3'                         |
| <b>B'</b> | 5'GGGTTCTCTAGTTAGCCA <del>ACTAGTT</del> TCTGCTTATATAGACC-3' |
| <b>C'</b> | 5'GGTCTATATAAGCAGA <del>ACTAGTT</del> GGCTAACTAGAGAACCC-3'  |
| <b>D'</b> | 5'GGTGGCTCTAGCGGATCTGAAGCTTAAG-3'                           |

## Chapitre III: Résultats

### 3.1 Constructions bicistroniques nécessaires pour l'étude des IRES de p53

Pour étudier le comportement des IRES de l'ARNm de p53 dans les cellules HEK293T et ensuite dans un modèle de sénescence, plusieurs constructions à deux luciférases ont été réalisées au laboratoire au début de cette étude (figure 3-1). Nous avons pris comme modèle le système bicistronique utilisé précédemment dans l'étude de l'IRES situé en 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) [204], c'est-à-dire un plasmide contenant les séquences codant pour la luciférase de la *Renilla* (Rluc) et de la luciole (Fluc) séparées par une région intercistronique où est inséré l'IRES étudié. Le principe d'utilisation des vecteurs à deux luciférases est illustré dans la figure 3-1B. L'expression des luciférases à partir d'un transcrite bicistronique est sous le contrôle du promoteur CMV. L'initiation de la traduction du premier gène codant pour la luciférase Rluc est coiffe-dépendante, tandis que la traduction du deuxième gène codant pour la luciférase Fluc dépend de l'IRES dans la région intercistronique. L'expression de Rluc et de Fluc dans les lysats cellulaires est évaluée, après transfection avec la construction bicistronique, en mesurant la lumière émise par les deux luciférases en présence de leur substrat (la D-luciférine pour Fluc; la coelenterazine pour Rluc) à l'aide d'un luminomètre, et analysée avec les logiciels Excel et GraphPad. L'activité IRES est évaluée par le rapport des activités luciférases Fluc/Rluc.

Les différentes régions correspondant à l'IRES1, l'IRES2 ou bien à l'IRES\* de p53 (voir figure 3-1A) ont été clonées dans un vecteur de base à deux luciférases pDual-VIH-1(-1). Ce dernier code pour les luciférases Rluc et Fluc séparées par une région intercistronique contenant la séquence de changement de cadre de lecture de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 [200]. Les différentes régions d'intérêt de l'ARNm de p53 ont remplacé la région intercistronique initialement présente dans le vecteur de base. La séquence de l'IRES1 est présente dans la région 5'UTR du messager de p53 et la séquence de l'IRES2 couvre les premiers 40 codons de la région codante de p53, tandis que la séquence IRES\* s'étend sur la

région 5'UTR et le début de la région codante, et contient donc l'IRES1 plus l'IRES2. De plus, deux dérivés de l'IRES\* ont été réalisés en mutant soit le codon initiateur (+1), ce qui correspond à la construction de l'IRES\*2, soit le codon initiateur (+40), ce qui correspond à la construction de l'IRES\*1. L'IRES\* et ses mutants devraient permettre de vérifier l'influence de la région codante sur l'activité de l'IRES1 ainsi que l'influence du 5'UTR sur l'activité de l'IRES2. Deux contrôles négatifs ont été également construits, en clonant la séquence complémentaire correspondant à l'IRES1 (SERI1) ou à l'IRES2 (SERI2) dans la région intercistronique du vecteur de base. Les premiers résultats de cette étude (voir plus loin, figure 3-2B) nous ont conduit par la suite à la construction d'un autre contrôle négatif ayant comme séquence, dans la région intercistronique, l'IRES inactivé du virus de l'encéphalomyocardite (nommé  $\Delta$ EMCV,  $\Delta$ E), un IRES très structuré qui a été inactivé par mutagenèse [199]. À noter que lors de la construction des vecteurs bicistroniques, trois codons de terminaison (UAG) ont été introduits après la séquence de Rluc pour favoriser une terminaison efficace du premier cistron, ainsi qu'une séquence *linker* précédant la séquence codant pour Fluc. Ce *linker* évite l'interférence de la région intercistronique avec le repliement de la luciférase Fluc. Par ailleurs, pour préserver le contexte du codon initiateur dans les différentes constructions IRES/SERI (comme, par exemple, la formation éventuelle d'une tige-boucle dans le voisinage du codon initiateur), 30 nucléotides du messenger de p53 ont été préservés à la suite du codon initiateur, précédant la séquence codant pour Fluc.

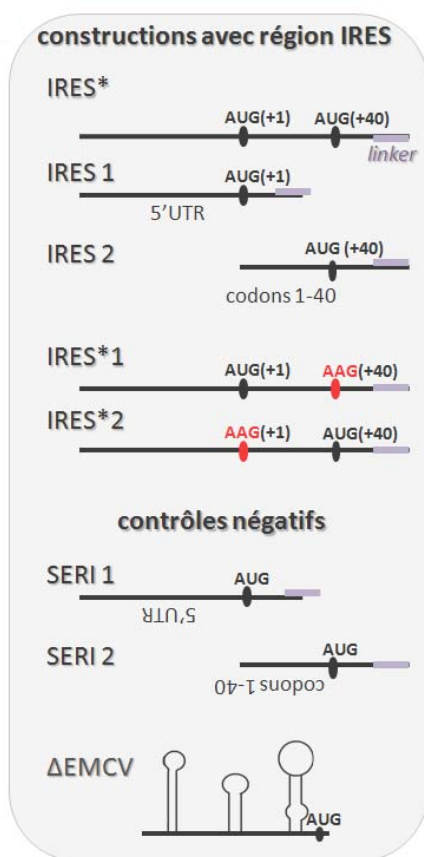


**Figure 3-1. Système d'étude bicistronique utilisé dans l'étude des IRES de l'ARNm de p53.**

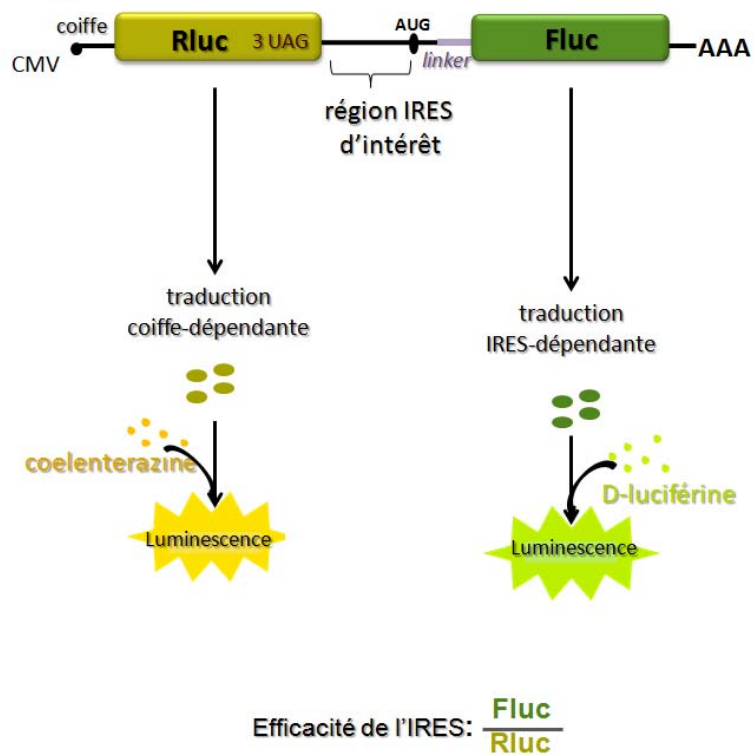
**A.** Régions IRES d'intérêt dans l'ARNm de p53 et séquences contrôles négatifs clonées dans la région intercistronique du système bicistronique, entre les séquences codant pour Rluc et Fluc.

**B.** Principe des essais luciférases avec le système bicistronique (voir texte, section 3.1).

A.



B.



### **3.2 Les IRES de p53 ne présentent pas d'activité significativement différente des contrôles SERI**

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression des luciférases à partir des constructions pDual-IRES-p53 réalisées, contenant les différentes régions IRES d'intérêt décrites dans la section précédente, ainsi que la reproductibilité des résultats dans les cellules HEK293T (figure 3-2 B, C). Le rapport des activités luciférases Fluc/Rluc obtenu pour le vecteur pDual-SERI1-p53, un des deux contrôles négatifs, a été arbitrairement fixé à 1. Ces premiers résultats nous ont montré que toutes les constructions expriment les deux luciférases. Cependant, nous observons que les activités de l'IRES1 et de l'IRES2 de p53, tels que décrits dans la littérature, ne sont pas significativement différentes par rapport aux contrôles négatifs correspondants, SERI1 et SERI2. Rappelons que les contrôles SERI représentent la séquence complémentaire de l'IRES1 de p53 ou de l'IRES2 clonée entre les luciférases Rluc et Fluc. Les structures avoisinant les codons initiateurs ne sont plus les mêmes par rapport au contexte des IRES. Nous ne nous attendions pas à obtenir des activités équivalentes dans les régions IRES et SERI. Pourquoi on s'imaginerait avoir une activité dans la région complémentaire d'une séquence contenant un IRES? Nous proposons deux hypothèses possibles expliquant les résultats obtenus : soit les activités IRES de p53 sont très faibles dans ces circonstances, car elles sont équivalentes aux activités des contrôles négatifs correspondants, soit les constructions SERI auraient elles aussi une activité IRES et ne seraient pas de bons contrôles négatifs. Nous avons construit alors un autre contrôle négatif pour vérifier cette deuxième hypothèse (voir plus loin, figure 3-3C).

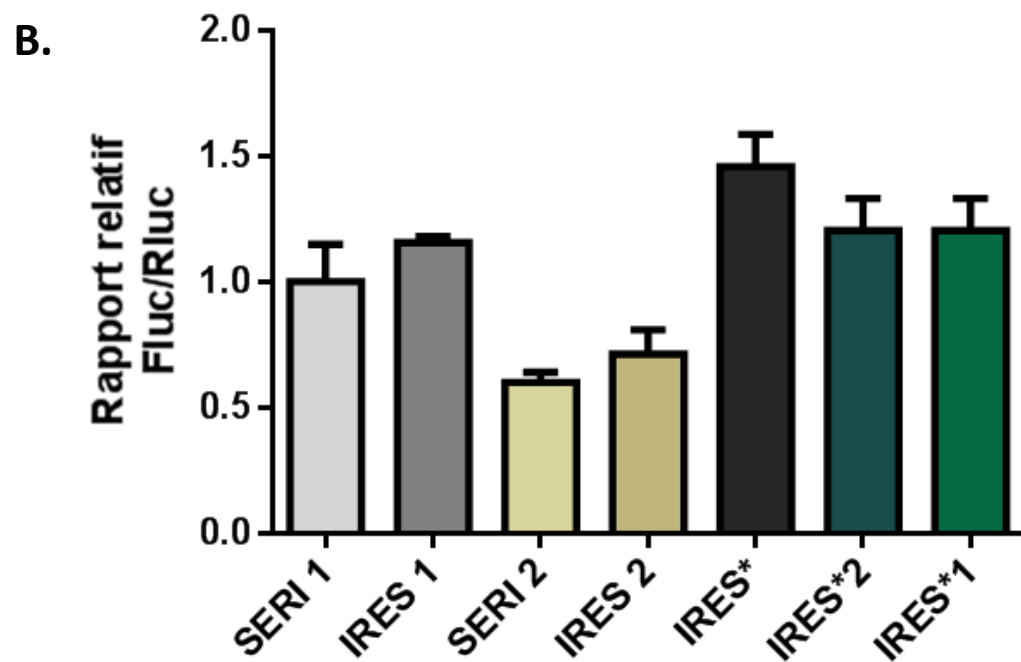
Nos premiers résultats indiquent également que l'activité de l'IRES\* et de ses mutants IRES\*1 et IRES\*2 sont similaires au contrôle SERI1. Nous n'observons pas d'influence de la région codante ou du 5'UTR sur l'activité de l'IRES1 et de l'IRES2, respectivement.

**Figure 3-2. Activité des différentes régions IRES d'intérêt de l'ARNm de p53 dans le système bicistronique.**

**A.** Modèle de vecteur bicistronique (pDual-IRES-p53) utilisé pour étudier les régions IRES d'intérêt de p53.

**B.** Activités des régions IRES de p53 exprimées par le rapport Fluc/Rluc. L'IRES1 correspond à la région 5'UTR, l'IRES2 correspond aux premiers 40 codons de la région codante, tandis que l'IRES\* couvre la région 5'UTR et les premiers 40 codons de la région codante. L'IRES\*1 comporte le codon initiateur (+40) muté, tandis que l'IRES\*2 comporte le codon initiateur (+1) muté. Les constructions ayant les régions SERI1 et SERI2 dans la région intercistronique sont les contrôles négatifs.

**C.** Exemple de valeurs des activités luciférases exprimées en nombre de comptes bruts dans un lysat de cellules HEK293T (5 uL) qui ont été transfectées avec les différents vecteurs bicistroniques ou avec le vecteur vide pcDNA 3.1. Trois expériences indépendantes en duplicata ont été effectuées.



C.

| Vecteur           | comptes   |            |
|-------------------|-----------|------------|
|                   | Fluc      | Rluc       |
| Blanc (pcDNA 3.1) | 687       | 1 291      |
|                   | 663       | 1 599      |
| pDual-SERI1       | 1 672 649 | 61 746 870 |
|                   | 1 852 945 | 49 869 845 |
| pDual-IRES1       | 1 568 067 | 35 372 335 |
|                   | 1 950 693 | 53 416 170 |
| pDual-SERI2       | 1 436 157 | 99 269 100 |
|                   | 2 064 877 | 88 752 700 |
| pDual-IRES2       | 2 025 828 | 88 213 680 |
|                   | 1 082 402 | 61 037 370 |
| pDual-IRES*       | 2 775 044 | 43 906 530 |
|                   | 2 342 846 | 43 183 755 |
| pDual-IRES*2      | 1 633 440 | 33 998 785 |
|                   | 1 760 801 | 44 028 890 |
| pDual-IRES*1      | 1 096 095 | 26 491 685 |
|                   | 1 728 477 | 33 966 592 |

### 3.3 Les IRES de p53 présentent une activité significative par rapport au contrôle négatif pDual- $\Delta$ EMCV(CTL)

L'activité des régions IRES d'intérêt n'étant pas significativement différente par rapport aux contrôles SERI, nous avons alors construit un nouveau contrôle négatif (pDual- $\Delta$ EMCV(CTL)), voir plus loin) et vérifié si, dans notre système bicistronique, il peut y avoir traduction du second cistron codant pour Fluc suite à divers événements de traduction, comme la réinitiation après la traduction du premier cistron ou la translecture du codon de terminaison indiquant la fin de la traduction de ce premier cistron.

La réinitiation peut avoir lieu après la traduction du premier cistron si la petite sous-unité ribosomique 40S ne se détache pas de l'ARNm après la rencontre du codon de terminaison et elle poursuit le balayage du messager. Par conséquent, la rencontre d'un prochain codon d'initiation dans le contexte Kozak (dans ce cas, le premier AUG rencontré à l'extrémité de la région intercistronique) pourrait entraîner le recrutement et l'association de la sous-unité 60S et le début d'un nouveau cycle d'initiation de la traduction [205]. Pour empêcher la réinitiation de la traduction de conduire à l'expression de Fluc, nous avons ajouté une séquence très structurée, soit l'IRES inactivé du virus de l'encéphalomyocardite ( $\Delta$ EMCV,  $\Delta$ E) [199] au début de la région intercistronique en amont de la séquence IRES d'intérêt (figure 3-3A). Cette structure est supposée de bloquer tout mouvement du ribosome le long du messager. Les constructions contenant cette structure sont nommées pDual- $\Delta$ E-IRES-p53.  $\Delta$ EMCV est un IRES inactivé couramment utilisé dans la littérature pour empêcher une réinitiation à partir des 40S ayant participé à la lecture du premier cistron d'un vecteur [199]. Ce même IRES inactivé a été utilisé aussi pour réaliser le nouveau contrôle négatif nommé pDual- $\Delta$ EMCV(CTL), où cette séquence  $\Delta$ EMCV constitue la région intercistronique du vecteur à deux luciférasés (figure 3-3C).

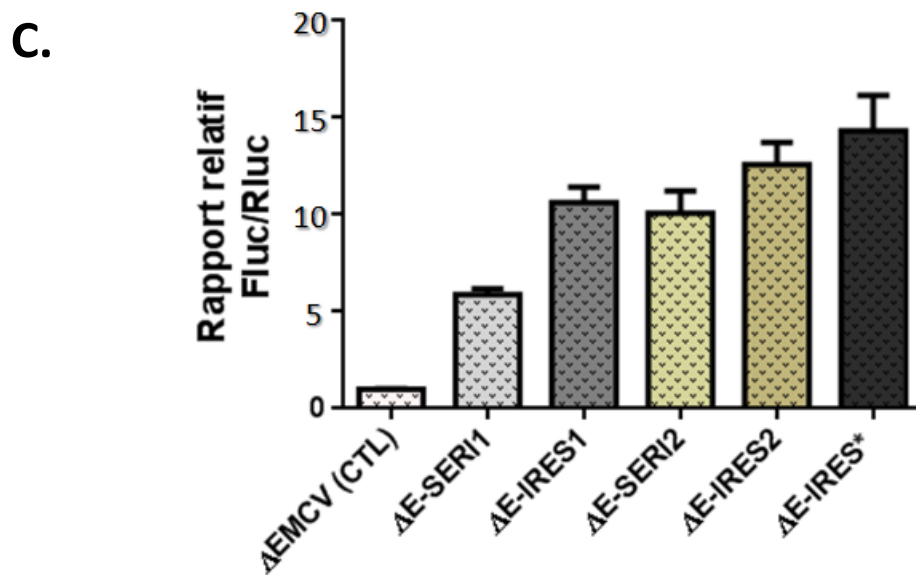
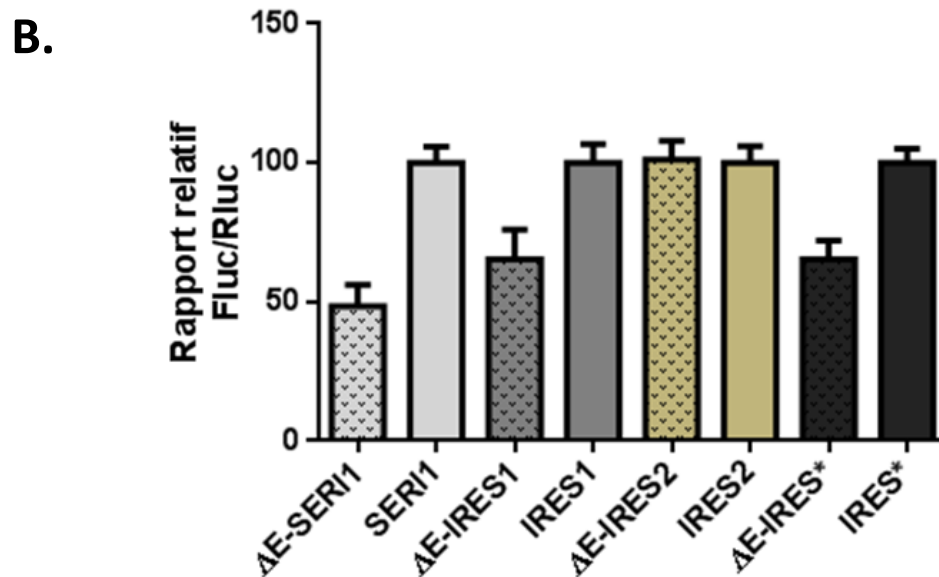
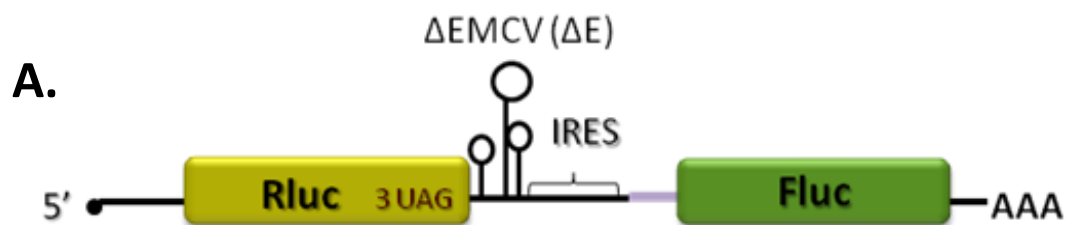
Un autre événement anormal de traduction, qui peut se produire dans le système bicistronique et conduire à l'expression du second cistron, est la translecture, soit la lecture d'un codon de terminaison par le ribosome comme étant un codon sens. Cela arrive lorsqu'un ARN de transfert, dont le codon diffère par une base d'un codon de terminaison, se lie au

**Figure 3-3. Activité des différentes régions IRES d'intérêt de l'ARNm de p53 dans le système bicistronique, après l'ajout d'une tige-boucle contrôle précédant la région IRES dans la région intercistronique.**

**A.** Modèle de vecteur bicistronique (pDual- $\Delta$ E-IRES-p53) utilisé pour étudier l'influence possible de la réinitiation ou de la translecture sur le rapport Fluc/Rluc.

**B.** Activités des régions IRES de p53 exprimées par le rapport Fluc/Rluc. L'activité des régions 5'UTR (IRES1), codons 1-40 (IRES2), 5'UTR+codons 1-40 (IRES\*) ou du contrôle négatif (SERI1) est évaluée dans les constructions bicistroniques (pDual-IRES-p53) par rapport aux activités des mêmes constructions comportant une région hautement structurée, l'IRES inactivé du virus EMCV ( $\Delta$ E ou  $\Delta$ EMCV). Une valeur de 100 est attribuée au rapport Fluc/Rluc obtenu pour les constructions sans  $\Delta$ EMCV.

**C.** Activité des différentes régions IRES d'intérêt du messenger de p53 par rapport au nouveau contrôle négatif  $\Delta$ EMCV(CTL). Une valeur de 1 est attribuée au  $\Delta$ EMCV(CTL). L'étude est réalisée dans les cellules HEK293T. Trois expériences indépendantes en duplicata ont été effectuées.





ribosome. Cet événement permet l'incorporation d'un acide aminé au niveau du codon de terminaison et donc la continuation de la traduction par le ribosome, ce qui entraîne la production d'une protéine de fusion Rluc-IRES-Fluc. Pour éviter cet événement, nous avons inséré dès le début de notre étude trois codons de terminaison (3 UAG, revoir figure 3-1B) après le premier cistron, ce qui assure une terminaison complète de la traduction du premier cistron. De plus, la présence de  $\Delta$ EMCV bloque tout mouvement des ribosomes, incluant les ribosomes qui auraient lu par erreur le codon de terminaison du premier cistron comme un codon sens.

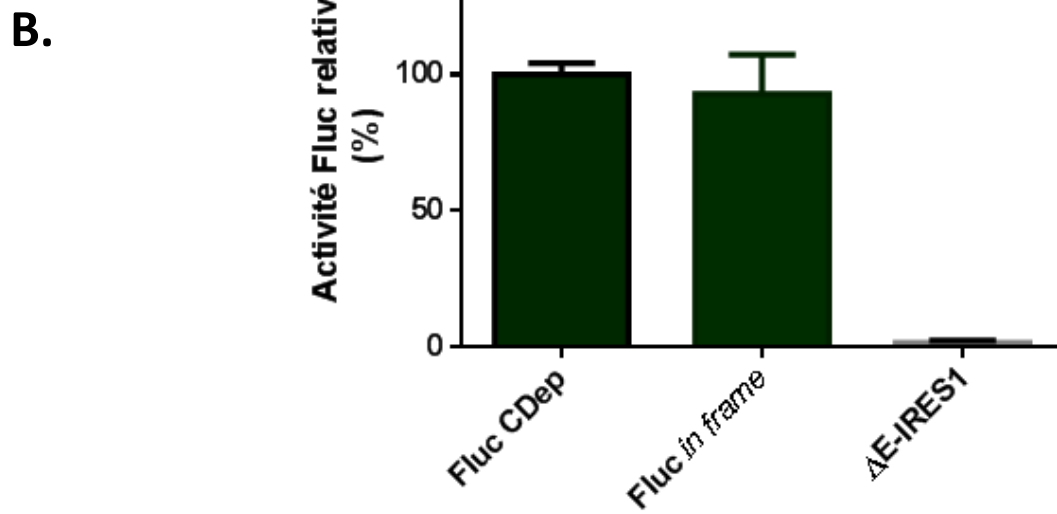
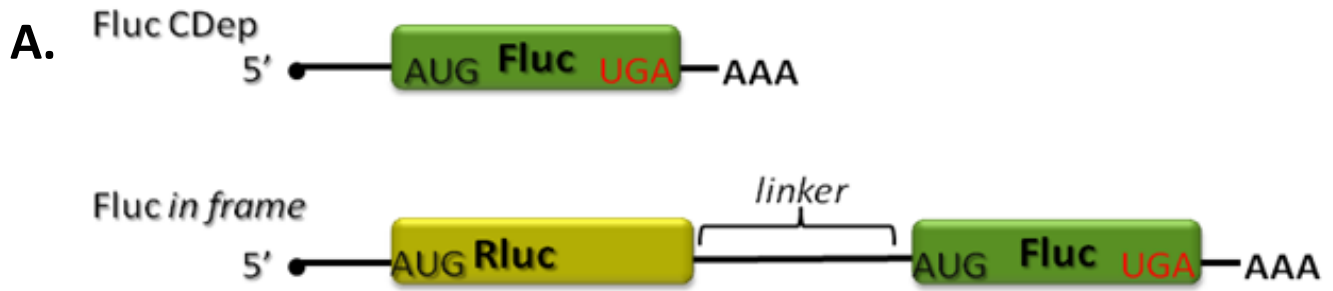
Les résultats obtenus après l'ajout de la séquence structurée  $\Delta$ EMCV en amont des régions IRES d'intérêt de p53 indiquent une diminution significative (de 25% à 50%) de l'activité IRES dans certains cas ( $\Delta$ E-SERI1,  $\Delta$ E-IRES1 et  $\Delta$ E-IRES\*) par rapport aux constructions sans la séquence  $\Delta$ EMCV (figure 3-3B). Nous suggérons que cette diminution de la traduction de Fluc correspond à l'élimination de protéine Fluc produite principalement par réinitiation. Une faible translecture n'est pas exclue, mais nous pensons que les trois codons de terminaison à la fin de la séquence codant pour Rluc ont empêché efficacement cet événement. Nous observons également qu'il n'y a pas de diminution d'activité de l'IRES2 précédé par le  $\Delta$ EMCV ( $\Delta$ E-IRES2). Il est possible que dans ce cas-ci, il n'y ait pas de réinitiation ou de translecture.

L'activité des IRES de p53 a aussi été examinée dans les cellules HEK293T en utilisant les constructions pDual- $\Delta$ E-IRES-p53 comparées au nouveau contrôle négatif pDual- $\Delta$ EMCV(CTL) décrit plus haut (figure 3-3C). Nous remarquons toujours l'absence de différence significative entre l'activité des IRES et celle des contrôles SERI. Notons que les différences des rapports Fluc/Rluc entre le contrôle négatif  $\Delta$ EMCV(CTL) et les constructions  $\Delta$ E-IRES sont significatives (6 à 15 fois supérieures). Nous ne pouvons cependant pas affirmer tout de suite que la séquence 5'UTR (IRES1), les premiers 40 codons (IRES2), ainsi que la région qui couvre les 2 séquences (IRES\*), aient une activité IRES. L'expression de Fluc pourrait dépendre d'un autre phénomène que l'existence d'un IRES (voir section 3.5). Cependant, dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les présumées activités IRES observées seraient suffisantes pour compenser pour l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante (voir section suivante).

**Figure 3-4. Expression de la luciférase Fluc via une initiation coiffe-dépendante vs. le mécanisme d'initiation présumé IRES-dépendant.**

**A.** Modèles de vecteurs exprimant Fluc via un mode d'initiation coiffe-dépendant. Le vecteur Fluc CDep est une construction monocistronique exprimant Fluc via une initiation coiffe-dépendante. Le vecteur Fluc *in frame* est une construction bicistronique contenant comme premier cistron la séquence de Rluc suivie d'une séquence *linker* dépourvue de codon de terminaison (région intercistronique) et de la séquence codant pour Fluc en deuxième cistron. Dans ce cas-ci également, Fluc est produite via un mécanisme d'initiation coiffe-dépendant.

**B.** Comparaison de l'expression de Fluc via le mode d'initiation coiffe-dépendant avec le mode d'initiation présumé IRES-dépendant. L'expression de Fluc via un mécanisme coiffe-dépendant (vecteurs Fluc CDep et Fluc *in frame*) correspond au 100% de l'expression de Fluc. Le vecteur bicistronique  $\Delta E$ -IRES1 contient la région 5'UTR du messenger de p53 précédée par la séquence hautement structurée  $\Delta EMCV$  et produit Fluc via un mécanisme impliquant un présumé IRES dans la région intercistronique. L'étude est réalisée dans les cellules HEK293T. Trois expériences indépendantes en duplicata ont été effectuées.



### 3.4 L'initiation de la traduction via les présumés IRES de p53 est négligeable par rapport à l'initiation coiffe-dépendante

Pour vérifier l'efficacité d'initiation de la traduction via les présumés IRES de p53 par rapport à l'initiation coiffe-dépendante, nous avons mesuré le niveau de Fluc produit via l'IRES1 de p53 par rapport au niveau de Fluc produit par le mécanisme d'initiation coiffe-dépendant. Pour cela, nous avons construit un vecteur monocistronique exprimant la luciférase Fluc via un mécanisme d'initiation coiffe-dépendant (Fluc CDep). Dans cette étude, un autre vecteur bicistronique, disponible au laboratoire, a été utilisé (Fluc *in frame*). Cette dernière construction contient les séquences des deux luciférases Rluc et Fluc dans le même cadre de lecture, séparées par une région *linker* et où le premier cistron ne se termine pas par un codon d'arrêt. Par conséquent, le vecteur bicistronique Fluc *in frame* permet la production d'une protéine de fusion Rluc-Fluc via un mécanisme coiffe-dépendant, tout comme le vecteur monocistronique Fluc CDep. Ces deux constructions sont utilisées comme référence pour l'expression de Fluc dépendante de la coiffe (figure 3-4A). Nous observons que la production de Fluc via la coiffe est environ 100 fois supérieure à la production de Fluc via l'IRES1 de p53 (figure 3-4B). Nous déduisons que l'activité de l'IRES1 de p53 pris en exemple (tout comme celle de l'IRES2 ou de l'IRES\* qui ont une activité semblable) est infime par rapport à l'initiation de la traduction via la coiffe. Même si les valeurs des activités IRES/SERI sont significatives par rapport au contrôle négatif  $\Delta\text{EMCV}(\text{CTL})$  (figure 3-3C), ces valeurs sont négligeables par rapport à la traduction coiffe-dépendante. Il ne semble pas possible que de telles activités IRES puissent compenser pour l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante. De plus, nous avons effectué une expérience supplémentaire qui nous amène à suggérer que l'expression de Fluc ne résulte pas de la présence d'un IRES (voir section suivante).

### **3.5 L'activité apparente des IRES de p53 semble être principalement due à un faible épissage à partir de sites cryptiques d'épissage**

Les deux régions du messenger de p53 identifiées avoir un IRES, soit le 5'UTR (IRES1) et les premiers 120 nucléotides du début de la région codante (codons 1-40; IRES2), ont été décrites dans la littérature, bien que les séquences exactes des IRES ne soient pas encore délimitées [56,57]. Cependant, nos résultats avec les contrôles pDual-SERI1/2-p53 (et  $\Delta$ E-SERI1/2), nous ont conduit à émettre des doutes en ce qui concerne l'existence des présumés IRES de p53. D'autant plus que nous avons trouvé que de nombreux présumés IRES bien décrits dans la littérature sont de faux IRES [206-208], où l'expression du second cistron résultait en fait de la présence d'un promoteur cryptique dans la région intercistronique ou d'un faible épissage impliquant un site donneur cryptique dans la séquence de Rluc et un site accepteur cryptique dans la région intercistronique.

La faible activité IRES/SERI observée pourrait provenir de la présence d'un promoteur cryptique dans la région intercistronique. À la différence du promoteur CMV qui produit des ARNm bicistroniques codant pour Rluc et Fluc, à partir des vecteurs pDual-IRES-p53 (ou  $\Delta$ E-IRES), le promoteur cryptique de la région intercistronique entraînerait la production de transcrits monocistroniques plus courts codant uniquement pour Fluc. Pour vérifier l'hypothèse de l'existence possible d'un promoteur cryptique dans la région intercistronique des vecteurs pDual-IRES1/IRES2 ou IRES\*, nous avons éliminé le promoteur CMV du vecteur pDual-IRES\*-p53, contenant la région 5'UTR plus le début de la région codant pour p53 entre Rluc et Fluc. Le nombre de comptes obtenus suite aux essais luciférase des lysats de HEK293T transfectées avec le vecteur pDual-IRES\* sans promoteur CMV n'est pas significativement différent du bruit de fond (résultats non présentés). Cette expérience nous permet d'affirmer que la séquence de l'IRES\*, plus spécifiquement la région 5'UTR + le début de la région codant pour p53, ne contient pas de promoteur cryptique. Nous avons ensuite vérifié si un faible épissage pourrait contribuer à la production de luciférase Fluc à partir des vecteurs pDual- $\Delta$ E-IRES/SERI-p53.

Il a été observé que dans la séquence de Rluc on retrouve un site donneur d'épissage [209]. Suite à cette observation, ce site d'épissage a été muté mais cela n'exclut pas qu'il

subsiste des sites d'épissage cryptique dans le gène de Rluc. Notons que s'il y avait épissage dans le cas de nos vecteurs, cet épissage serait très limité puisque nous avons vu que l'expression de Fluc produite dans nos expériences ne correspond qu'à environ 1% de Fluc produite via le mécanisme coiffe-dépendant (figure 3-4). Nous avons vérifié si la séquence intercistronique IRES/SERI contient un site d'épissage accepteur cryptique. La présence d'un site accepteur cryptique dans la région intercistronique entraînerait la production des transcrits codant pour le produit de fusion Rluc-Fluc contenant une portion de Rluc et générant Fluc uniquement, par le mécanisme d'initiation coiffe-dépendant. Nous avons effectué de nouvelles constructions à partir des vecteurs pDual- $\Delta$ E-IRES dans lesquels nous avons cloné la séquence  $\Delta$ EMCV en 5' de Rluc (figure 3-5A). L'ajout de  $\Delta$ EMCV en 5' de Rluc bloque la traduction coiffe-dépendante du gène de Rluc. Si Fluc est produite à partir d'un ARNm épissé contenant un fragment de Rluc fusionné à Fluc, la synthèse de Fluc serait également bloquée. Si par contre, la synthèse de Fluc n'est pas affectée, elle résulte d'une activité IRES (figure 3-5B). Dans ce cas, cela signifierait qu'il y a un IRES dans les régions proposées mais aussi dans leur séquence complémentaire!

Nos résultats montrent que l'ajout de  $\Delta$ EMCV en 5' de Rluc ne réprime pas uniquement la synthèse de Rluc (1-2% restant), mais également celle de Fluc (10-20% restant, figure 3-5C,D). Nous remarquons donc que l'activité restante de Fluc produite via l'initiation IRES-dépendante est très faible par rapport à l'activité Fluc des vecteurs sans  $\Delta$ EMCV en 5'. Puisque l'ajout de  $\Delta$ EMCV en 5' affecte grandement la production de Fluc, nous suggérons qu'un site d'épissage cryptique accepteur se trouverait dans les régions IRES ou SERI, participant à la production des messagers Rluc-Fluc, contenant le fragment N-terminal de Rluc (ou même pas de Rluc si le site d'épissage se trouve dans la région 5'UTR de Rluc) et la séquence complète de Fluc. Par conséquent, Fluc est synthétisée selon un mécanisme coiffe-dépendant. La région intercistronique est éliminée en partie. Nous répétons que l'épissage dû à un site accepteur cryptique dans la région IRES ou SERI serait peu efficace dans nos constructions (pDual- $\Delta$ E-IRES/SERI) car le niveau de protéine Fluc produite est très faible par rapport au 100% de Fluc produite via l'initiation coiffe-dépendante (Fluc CDep, figure 3-4).

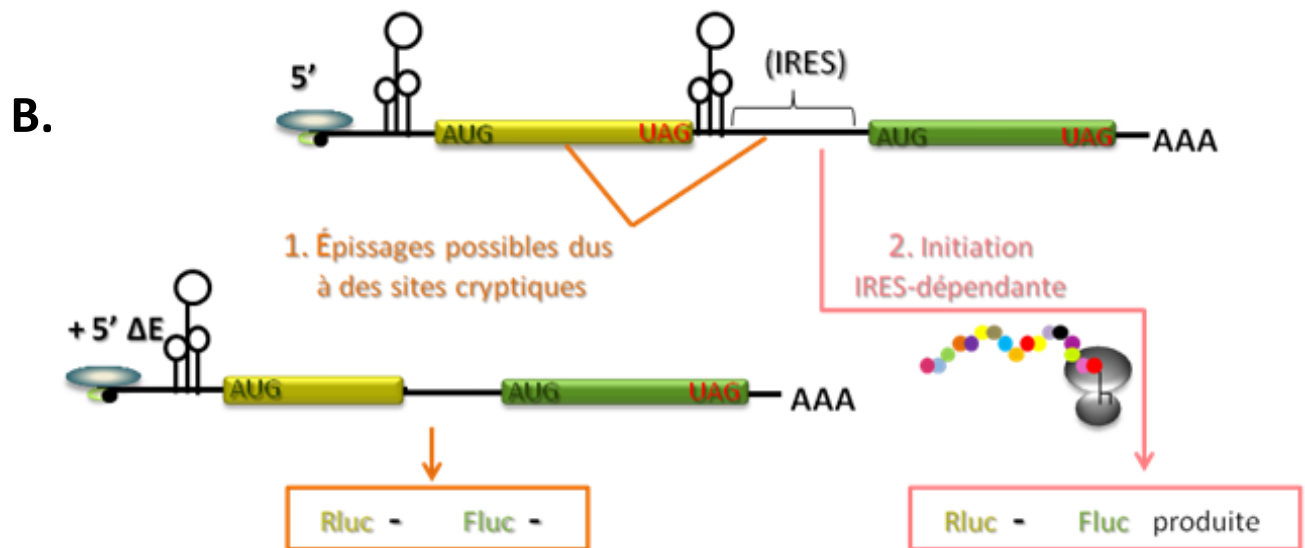
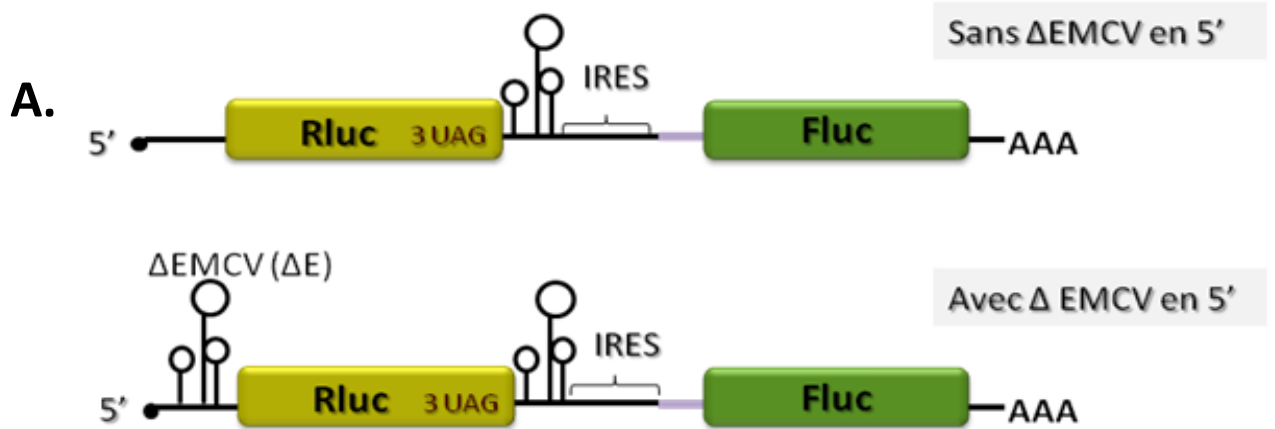
**Figure 3-5. Activité des différentes régions IRES d'intérêt de l'ARNm de p53 dans le système bicistronique, après l'ajout d'une structure en 5' du messenger, empêchant la traduction coiffe-dépendante.**

**A.** Modèle de vecteur utilisé pour vérifier la présence possible d'un site cryptique d'épissage dans le système bicistronique et son influence sur le rapport Fluc/Rluc.

**B.** Situations possibles conduisant à l'expression de Fluc : 1. via un site d'épissage cryptique se trouvant dans la région intercistronique ou 2. via une initiation interne de la traduction (IRES). L'ajout de  $\Delta$ EMCV en 5' de Rluc ne devrait pas affecter l'expression de Fluc si elle est produite via l'IRES de la région intercistronique.

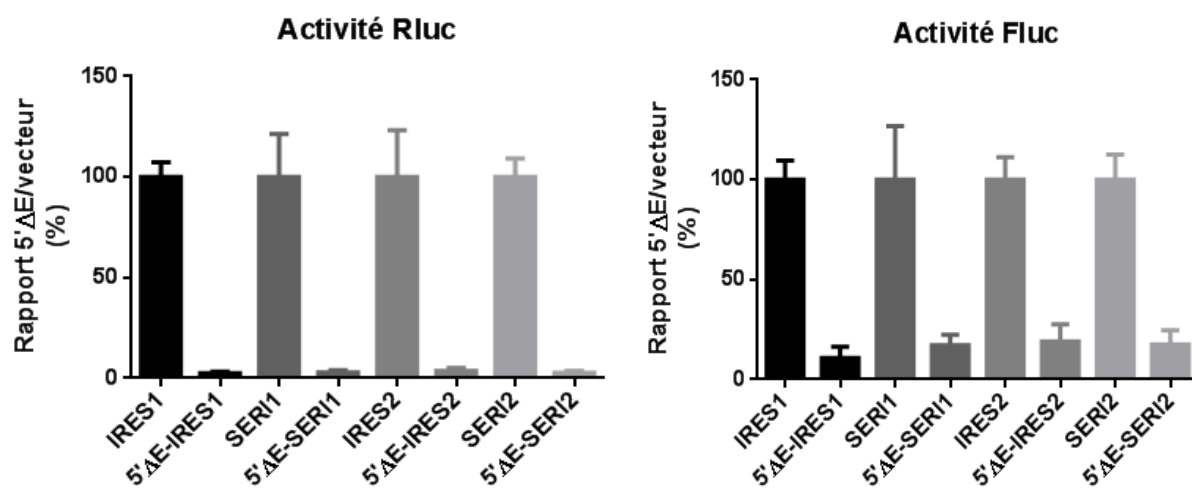
**C.** Activité des régions 5'UTR (IRES1), codons 1-40 (IRES2), ou des contrôles négatifs (SERI1, SERI2), tous précédés de  $\Delta$ EMCV, par rapport aux activités des mêmes constructions comportant de plus la région hautement structurée  $\Delta$ EMCV ( $\Delta$ E) en 5' de Rluc.

**D.** Exemple de valeurs des activités luciférases résiduelles (exprimées en %), après l'ajout de  $\Delta$ EMCV en 5' de Rluc, mesurées dans un lysat de HEK293T. Trois expériences indépendantes en duplicata ont été effectuées.





C.



D.

| Vecteur/ Activité luciférase | <u>Rluc</u> (%) | <u>Fluc</u> (%) |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| - ΔEMCV en 5'                | 100             | 100             |
| + ΔEMCV en 5'                | 1-6             | 10-20           |

En conclusion, les résultats obtenus montrent que les régions IRES d'intérêt du messenger de p53 (IRES1: 5'UTR, IRES2: début région codante, IRES\*: 5'UTR+début région codante) ont une activité relativement significative par rapport au contrôle négatif  $\Delta$ EMCV(CTL) dans les cellules transformées HEK293T. Cependant, ces activités sont très faibles. De plus, nos résultats suggèrent fortement que ces activités, tout comme les activités des régions SERI, séquences complémentaires des IRES correspondants, proviennent d'un faible épissage dû à un site cryptique dans la région intercistronique. Il a été montré cependant que de nombreux IRES ont une très faible activité dans des conditions normales mais sont stimulés en conditions de stress, lorsque la traduction coiffe-dépendante est réprimée [114,142,146]. Nous avons donc fait quelques expériences préliminaires pour examiner s'il y a une activité IRES dans la région 5'UTR et au début de la région codante du messenger de p53, lorsque les cellules deviennent sénescents.

### 3.6 L'expression de Fluc n'augmente pas dans la sénescence

Nous avons examiné l'activité des présumés IRES du messenger de p53 dans des fibroblastes humains sénescents (IMR90), afin de déterminer si cette activité est augmentée dans les conditions de sénescence. Les fibroblastes étant des cellules primaires, leur taux de transfection est très faible en utilisant des agents classiques de transfection transitoire. Par conséquent, nous avons eu recours à la transfection stable des fibroblastes à l'aide de la technique d'infection avec des vecteurs rétroviraux. Dans ce but, nous avons généré de nouvelles constructions en clonant la cassette Rluc- $\Delta$ E-IRES-Fluc dans le vecteur rétroviral de base pMSCV (figure 3-6A). Ces constructions ont été utilisées lors de l'infection des fibroblastes IMR90 jeunes. Des essais luciférase ont été par la suite effectués à partir des lysats de fibroblastes jeunes infectés et des lysats de fibroblastes sénescents issus de la co-infection avec l'oncogène Ras ou de la sénescence réplivative. Tout comme dans les HEK293T, l'efficacité des IRES de p53 dans les fibroblastes a été évaluée par l'activité Fluc normalisée par rapport à celle de Rluc.

Si l'expression de Fluc provient d'un transcrite épissé, qui est sous contrôle d'une traduction coiffe-dépendante, le rapport Fluc devrait demeurer semblable dans les cellules sénescents et non-sénescents. Par contre, si l'expression de Fluc dépend d'un IRES activé dans les conditions de sénescence, ce rapport devrait augmenter suite à la diminution de l'expression de Rluc (coiffe-dépendante) et l'augmentation de l'expression de Fluc (IRES-dépendante). D'une part, la traduction coiffe-dépendante est réprimée, puisque la sénescence est accompagnée entre-autres d'un stress oxydatif connu pour inhiber l'initiation de la traduction coiffe-dépendante [68,69,72,111], d'autre part, la production de Fluc devrait augmenter si la région intercistronique comporte un véritable IRES activé par le stress conduisant à la sénescence.

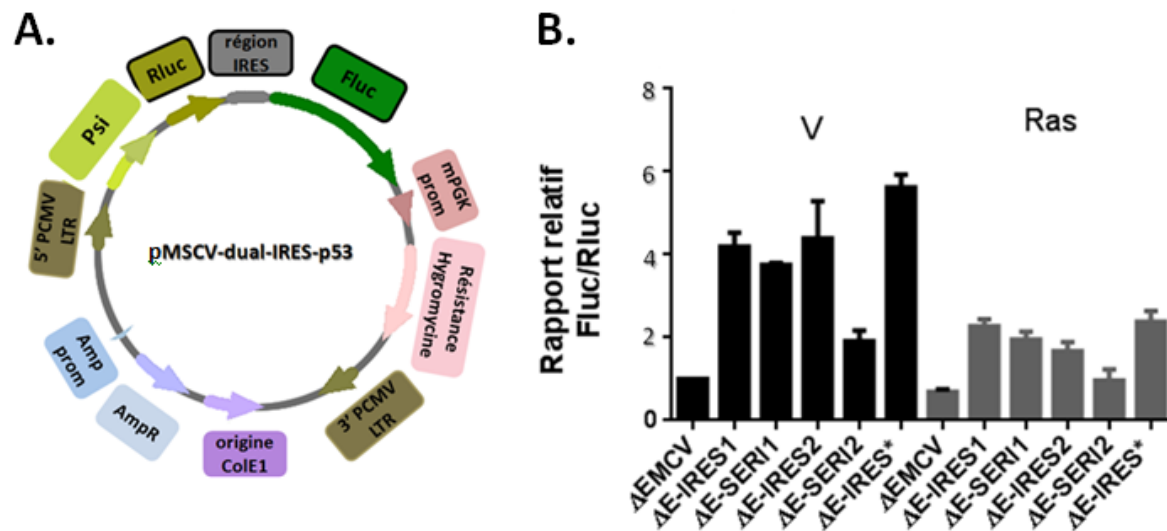
Les résultats obtenus chez les fibroblastes sénescents exprimant de manière stable la cassette Rluc- $\Delta$ E-IRES-Fluc, et où la sénescence a été induite par Ras, nous indiquent que le rapport Fluc/Rluc n'augmente pas par rapport aux résultats obtenus chez les fibroblastes non sénescents (figure 3-6 B, C). En fait, ce rapport diminue, semblant indiquer que la traduction du transcrit épissé exprimant la Fluc est plus rapidement affectée. La diminution du rapport Fluc/Rluc nous indique qu'il n'y a pas d'IRES dans la région 5'UTR (IRES1) du messenger de p53, au début de la région codante (IRES2) ou dans la région couvrant les deux séquences (IRES\*). Les résultats obtenus dans le contexte de sénescence répllicative chez les fibroblastes (résultats non présentés) sont semblables aux résultats obtenus pour la sénescence induite par l'oncogène Ras, ce qui semble confirmer qu'il n'y a pas d'IRES dans l'ARNm de p53, que ce soit dans la région 5'UTR ou au début de la région codante, et que ce soit en conditions normales ou en conditions de stress. Nos résultats contredisent donc toute une littérature basée sur l'existence de ces IRES.

**Figure 3-6. Activité des présumés IRES de p53 dans la sénescence.**

**A.** Rapporteur rétroviral dérivé du vecteur pMSCV, contenant les différentes régions IRES de p53 précédées par la structure en tige-boucle  $\Delta$ EMCV, utilisé dans la sénescence. Les régions importantes sont définies en couleur sur le vecteur : l'origine de réplication (origine ColE1), les régions 5'LTR et 3'LTR nécessaires pour la transcription et l'intégration du transcrit au génome de la cellule hôte, la séquence du signal d'encapsidation (Psi), les séquences Rluc,  $\Delta$ E-IRES et Fluc, le gène de résistance à l'hygromycine sous le contrôle du promoteur mPGK et le gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) sous le contrôle de son promoteur (Amp prom). Les vecteurs rétroviraux pMSCV sont utilisés pour la transfection stable par infection des fibroblastes primaires humains (IMR90) afin d'étudier le comportement des IRES de p53 dans la sénescence.

**B.** Activités des présumés IRES de p53 dans des fibroblastes sénescents, où la sénescence a été induite avec l'oncogène Ras. L'IRES1 correspond au 5'UTR du messenger de p53, l'IRES2 correspond au début de la région codante de p53 (codons 1-40), tandis que SERI1 et SERI2 sont des séquences contrôles.

**C.** Valeurs des activités luciférases exprimées en nombre de comptes dans un lysat de fibroblastes humains IMR90 sénescents (40  $\mu$ L) co-infectés avec les différents vecteurs rétroviraux et avec pBabe-Ras, ou bien avec le vecteur vide pMSCV.



**C.**

| <u>Vecteur</u> | <u>comptes lysat</u> |             |
|----------------|----------------------|-------------|
|                | <u>Fluc</u>          | <u>Rluc</u> |
| Blanc (MSCV)   | 960                  | 1 073       |
| ΔEMCV          | 5 237                | 5 400 794   |
|                | 4 968                | 5 287 984   |
| ΔE-IRES 1      | 10 195               | 3 467 860   |
|                | 12 855               | 4 449 921   |
| ΔE-SERI 1      | 13 499               | 6 584 535   |
|                | 14 908               | 6 730 843   |
| ΔE-IRES 2      | 17 904               | 11 475 665  |
|                | 14 582               | 7 640 702   |
| ΔE-SERI 2      | 11 474               | 12 712 742  |
|                | 12 561               | 11 514 652  |
| ΔE-IRES*       | 17 726               | 9 247 083   |
|                | 21 292               | 8 312 912   |

## Chapitre IV : Discussion

### 4.1 Justification du projet et bref aperçu de résultats

Le but de mon projet de recherche était d'identifier les éléments-clés modulant l'activité des IRES de l'ARNm de p53 et ensuite d'étudier leur comportement dans la sénescence. La présence de deux IRES dans le messager de p53 semblait démontrée dans la littérature et de nombreux articles interprétaient les résultats décrivant une augmentation du niveau de p53 en condition de stress comme la conséquence d'une stimulation de l'activité de ces IRES. En outre, l'article de Ruggero publié dans *Embo Journal* mentionnait qu'il y avait augmentation de l'activité de l'IRES en 5'UTR du messager de p53 dans la sénescence [185].

Nos résultats ont montré que le système de vecteurs à deux luciférases ne permet pas d'observer une activité IRES dans l'ARNm de p53 par rapport à un contrôle négatif dépourvu d'IRES. Notre étude nous a permis d'infirmer l'existence des IRES dans l'ARNm de p53. Nous suggérons plutôt que la synthèse de p53 en conditions de stress cellulaire, tel que la sénescence, pourrait être coiffe-indépendante, ce qui signifie qu'elle ne dépend pas du facteur eIF4E interagissant avec la coiffe, mais non IRES-dépendante puisque le ribosome n'est pas recruté directement à l'intérieur du messager via des éléments internes.

## 4.2 Réexamen des données qui affirment l'existence d'un ou deux IRES dans l'ARNm de p53

L'existence d'un ou deux IRES dans l'ARNm de p53 a été proposée indépendamment par Das [57] et Yang [56] et l'hypothèse que cette activité serait stimulée dans la sénescence a été évoquée par Ruggero [185]. Suite à nos résultats, nous proposons un examen approfondi de ces résultats.

### 4.2.1 L'étude de Das décrit deux régions IRES dans l'ARNm de p53

L'étude de Das [57] conclut que l'ARNm de p53 contient deux régions ayant une activité IRES : l'une dans la région 5'UTR du messenger (que nous nommons l'IRES1) et l'autre dans les 120 premiers nucléotides de la région codante (codons 1-40; que nous nommons l'IRES2). Les auteurs ont utilisé un vecteur bicistronique à deux luciférases, où les séquences de l'ARN messenger de p53 utilisées étaient identiques à celles que nous avons employées (voir étude de Das [57]). Par contre, il peut y avoir des variations dans les séquences Rluc et Fluc ainsi que dans la région 5'UTR de Rluc. Leur étude est faite dans des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) ou bien dans des cellules H1299 (carcinome de poumon humain). Les valeurs des activités IRES que trouvent Das et son groupe sont en accord avec nos observations. Les auteurs ont observé que les activités de l'IRES1 et de ce qu'ils nomment l'IRES2, mais qui correspond à IRES\*2 selon notre nomenclature, sont 12 fois supérieures au même contrôle négatif que le notre. Ils ont également observé que la mutation du premier AUG n'influait pas l'activité IRES de leur construction IRES\*. Tout comme pour notre étude, les activités IRES ne résultaient pas de la présence d'un promoteur cryptique.

Contrairement à nous, le groupe de Das affirme qu'il n'y a pas d'épissage cryptique dans son système bicistronique. En utilisant les techniques d'immunobuvardage de type *Northern* et de RT-PCR, les auteurs n'observent pas d'ARN additionnel à l'ARN correspondant au messenger bicistronique. Ils admettent toutefois que ces techniques ne sont pas assez sensibles pour détecter des transcrits résultant d'un faible épissage. Cependant, lorsqu'ils introduisent en 5' du messenger bicistronique une structure en tige-boucle qui empêche l'initiation de la traduction coiffe-dépendante, leurs résultats divergent des nôtres. En effet, lorsqu'ils insèrent la même



structure que nous (le  $\Delta$ EMCV) en 5' du messenger bicistronique, l'activité Rluc diminue fortement mais, contrairement à nos observations, l'activité Fluc ne diminue pas significativement. Pour expliquer cette contradiction, nous pourrions imaginer qu'un site d'épissage donneur se trouve dans la région 5'UTR de Rluc du vecteur bicistronique et un site d'épissage accepteur se trouve dans la région intercistronique (5'UTR du messenger de p53 ou codons 1-40). Cependant, le site d'épissage donneur se trouverait entre la tige-boucle ajoutée en 5' du messenger et la séquence de Rluc dans notre système, tandis qu'il se trouverait en amont de la tige-boucle inhibant la traduction dans le système de Das (figure 4-1). De la sorte, la structure inhibante serait conservée dans le transcrit résultat d'un épissage dans nos expériences mais pas dans le cas du groupe de Das, ce qui expliquerait notre divergence.

Les auteurs ont également transfecté directement des cellules en culture avec les ARN bicistroniques correspondant à leurs vecteurs bicistroniques et ils ont obtenu les mêmes résultats que lors de l'utilisation des plasmides. Dans le cas de la transfection directe de l'ARN dans les cellules, il n'y a pas d'épissage possible. D'ailleurs, ce type d'expérience a fréquemment révélé l'absence d'activité IRES dans des régions 5'UTR de messagers où il avait été proposé qu'il existe une activité IRES. Comment expliquer alors les divergences entre les résultats du groupe de Das et les nôtres? Une explication purement spéculative est que le ribosome effectuerait un saut [155] dans leurs constructions et que ce saut lui permettrait d'éviter l'effet inhibiteur de la structure introduite dans la région 5'UTR du messenger (figure 4-2). Puisque ce phénomène se manifeste lors de la traduction, il pourrait se produire aussi bien lorsque les cellules sont transfectées avec les vecteurs à deux luciférases qu'avec les ARN bicistroniques correspondants. (voir plus loin, section 4.3.3).

Le groupe de Das a également comparé les résultats obtenus avec des constructions contenant la structure  $\Delta$ EMCV dans la région intercistronique, avant les présumés IRES de p53. Une critique que nous pouvons formuler concerne le fait que l'activité de cet IRES augmente alors. Cela devrait être le contraire puisque la présence de la structure complexe empêche des ribosomes ayant réinitié ou effectué une translecture de traduire Fluc et c'est d'ailleurs ce que nous observons.

**Figure 4-1. Modèle réconciliant l'étude du groupe de Das et notre étude en rapport avec une structure en tige-boucle en 5' du messager bicistronique qui empêche la traduction de Rluc.**

Le modèle présente le système bicistronique contenant le gène de la *Renilla* (Rluc, en jaune) et le gène de la luciole (Fluc, en vert) séparés par la région IRES d'intérêt. Une tige-boucle inhibant la traduction de Rluc est présente en 5' de Rluc. Les éléments du système bicistronique du groupe de Das (A) sont les mêmes que ceux de notre système bicistronique (B), sauf la région 5'UTR de la Rluc. Dans les deux cas, un site d'épissage cryptique accepteur se trouve probablement dans la région IRES intercistronique (le 5'UTR du messager de p53 (IRES1) ou les premiers codons 1-40 (IRES2)).

**A.** Dans l'étude de Das, un site d'épissage cryptique donneur se trouverait avant la tige-boucle de sorte que l'épissage éliminerait la tige-boucle et la séquence codant pour Rluc. Le transcrit résultant produit uniquement la Fluc.

**B.** Dans notre étude, un site d'épissage cryptique donneur se trouverait après la tige-boucle de sorte que l'épissage éliminerait probablement la séquence de Rluc mais pas la tige-boucle en 5' du messager. Le transcrit résultant contenant la tige-boucle empêche la traduction de Fluc. Il n'y aura production ni de Rluc, ni de Fluc.

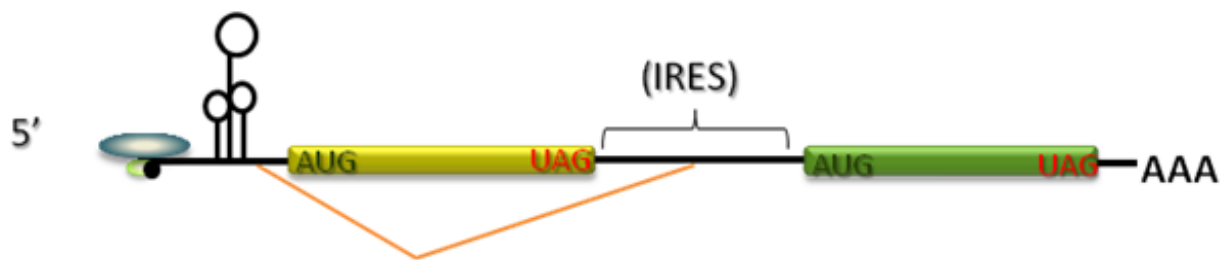
### A. Étude de Das



↓ Perte de la tige-boucle en 5':  
pas de Rluc, mais Fluc est produite



### B. Notre étude



↓ Préservation de la tige-boucle en 5':  
pas de Rluc, pas de Fluc



Une autre critique que nous apportons à cet article et qui a suscité notre intérêt porte sur la construction utilisée pour déterminer l'activité de l'IRES de la région codante (l'IRES2) du messager de p53. Les auteurs n'ont pas pris uniquement les premiers 120 nucléotides de la région codante (codons 1-40) pour étudier son activité dans le vecteur bicistronique, mais également la région 5'UTR ayant le premier codon initiateur muté (AAG(+1)). Il serait donc faux d'attribuer l'activité IRES2 à la région codante sans prendre en considération l'influence possible de la région 5'UTR qui se trouve en amont. Pour cette raison, nous avons réalisé la construction nommée pDual-IRES2-p53, qui ne contient que les premiers 120 nucléotides de la région codante pour p53, ainsi que la construction pDual-IRES\*2, qui contient le 5'UTR + le début de la région codante du messager de p53 où le premier codon initiateur a été muté (figure 4-3).

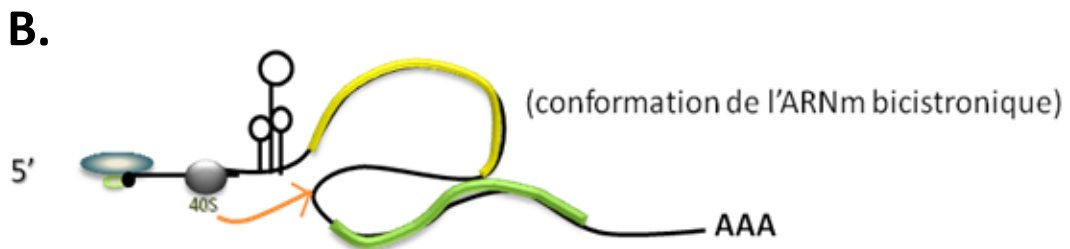
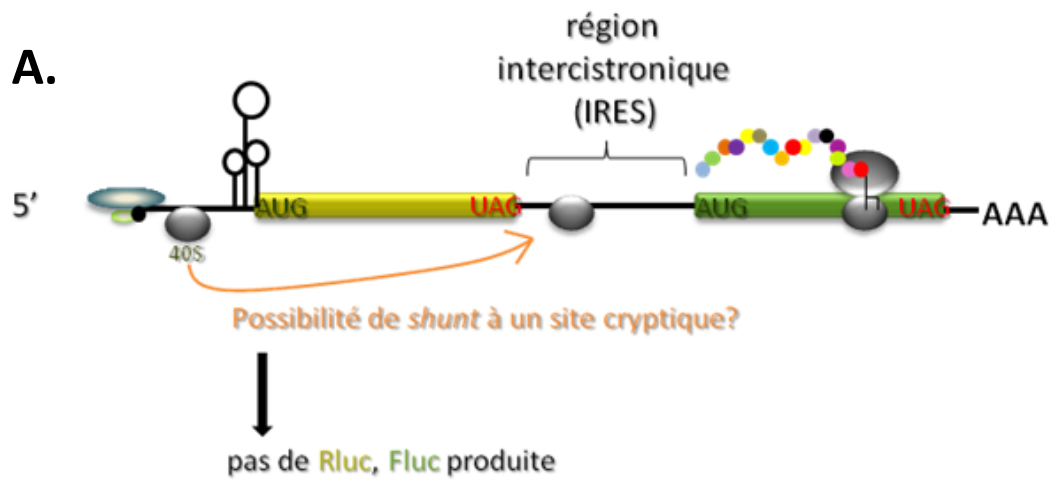
Selon la structure proposée par le groupe de Ciesiolka pour la région 5'UTR de l'ARNm de p53 [184] (figure 1-4, Introduction) et selon les résultats du groupe de Das [57], nous avons pensé qu'il serait possible qu'il y ait un seul IRES dans le messager de p53, occupant la région qui couvre le 5'UTR et le début de la région codante. Cet unique IRES serait capable d'initier au premier ou au second codon initiateur, dépendamment des conditions. D'ailleurs, un cas où un IRES permet l'initiation de la traduction à l'un de deux codons initiateurs a déjà été observé chez le virus de l'hépatite C (VHC) [210] où suivant les conditions, la sous-unité 40S peut, à partir du même IRES, initier la traduction de la polyprotéine du virus ou d'une protéine dite F, dans un autre cadre de lecture. Nous avons alors décidé d'étendre les régions IRES1 et 2, afin d'obtenir l'IRES\* tout en mutant les codons initiateurs correspondant à la région ajoutée (obtenant les constructions IRES\*1 et IRES\*2). Cependant, le système d'étude bicistronique utilisé ne nous a pas permis, comme nous l'avons discuté, de valider la présence d'un/des IRES dans l'ARNm de p53. Il faut remarquer que, dans la littérature sur les IRES de p53, il s'est produit une dérive subtile attribuant donc l'activité IRES2 aux premiers 120 nucléotides de la région codante pour p53, contrairement aux conditions expérimentales initiales définissant cet IRES.

**Figure 4-2. Modèle additionnel expliquant l'expression de Fluc dans le système bicistronique du groupe de Das.**

Système bicistronique contenant le gène de la *Renilla* (Rluc, en jaune) et le gène de la luciole (Fluc, en vert) séparés par la région IRES d'intérêt. Une tige-boucle inhibant la traduction de Rluc est présente en 5' de Rluc.

**A.** Lors du balayage du 5'UTR du messager bicistronique, le ribosome pourrait rencontrer un site cryptique pour effectuer un saut dans les constructions de Das, ce qui lui permettrait d'éviter l'effet inhibiteur de la structure introduite en 5' de Rluc. Le ribosome atterrirait plus loin, avant ou dans la région intercistronique, et aurait la possibilité d'initier la traduction du deuxième cistron. Dans ce cas-ci, Fluc sera produite.

**B.** Modèle plus représentatif du contexte de la traduction illustrant des structures secondaires dans la conformation de l'ARN messager bicistronique, de sorte que certaines régions éloignées puissent se trouver dans le voisinage du ribosome, ce qui favorise le saut du ribosome lorsqu'il rencontre des structures secondaires stables durant le balayage du messager, à la rencontre d'un codon initiateur.



## **4.2.2 L'étude de Yang s'oppose aux observations de Fahraeus concernant la présence d'un IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53**

### **4.2.2.1 L'étude de Yang décrit un IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53**

Yang et al. [56] ont décrit un IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53, mis en évidence avec un vecteur bicistronique à deux luciférases. Tout comme le groupe de Das, ils ont montré qu'il n'y avait pas de promoteur cryptique qui serait responsable de l'expression de Fluc. Les auteurs ont également suggéré qu'il n'y avait pas d'épissage cryptique en se basant sur l'absence de bandes supplémentaires lors d'une analyse par RT-PCR. Rappelons toutefois que la sensibilité de cette méthode risque d'être insuffisante pour détecter les produits d'un épissage cryptique présents en très faibles quantités [206,211].

Yang et al. [56] ont montré dans un premier temps que le niveau de p53 est grandement augmenté en présence d'étoposide, un agent causant des dommages à l'ADN. Dans ces conditions, le niveau d'ARNm de p53 ne change pas et le niveau de polysomes associés au messager de p53 augmente dans le cytoplasme, ce qui démontre que c'est la traduction de p53 qui est grandement stimulée dans ces conditions de stress et non la transcription de l'ARNm. Les auteurs sont alors passés au système à deux luciférases, montrant l'existence d'un IRES dans le messager de p53. De plus, la délétion des 70 premiers nucléotides de la région 5'UTR de p53 supprime l'activité de leur IRES, ce qui les conduit à suggérer que cette région contient l'IRES de p53. Cela est en contradiction avec différents travaux de l'équipe de Das, soulignant l'importance du reste de la région 5'UTR pour lier différents présumés facteurs ITAF et influencer l'activité IRES de p53 [188,212,213]. Cependant, Yang et al. n'ont jamais vérifié que l'insertion de cette courte région seule (premiers 70 nucléotides du 5'UTR) dans un vecteur bicistronique avait une activité IRES. De plus, l'augmentation de l'activité IRES présumée qu'ils observent en conditions de stress est très faible (d'environ 1.5 fois) et ne pourrait pas expliquer l'augmentation de la traduction de p53, qui est beaucoup plus importante.

**Figure 4-3. Étude de l'IRES2 du messenger de p53 dans le système bicistronique.**

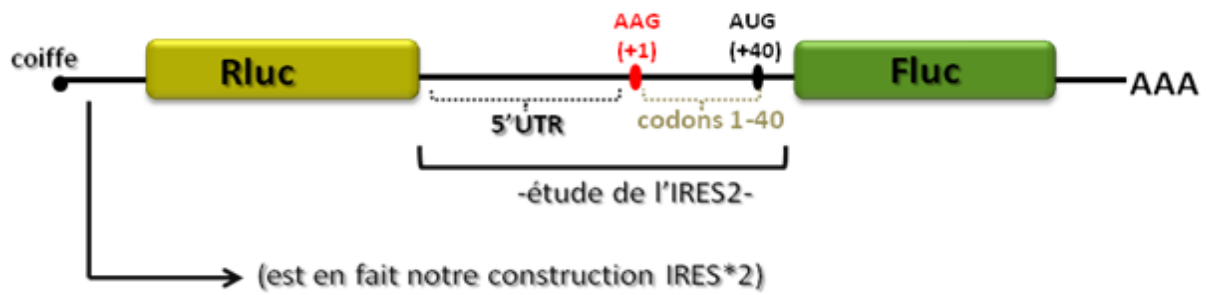
Système bicistronique contenant le gène de la *Renilla* (Rluc) et le gène de la luciole (Fluc) séparés par la région IRES d'intérêt.

**A.** Dans l'étude du groupe de Das, le vecteur utilisé pour étudier l'IRES2 de p53 contient dans la région intercistronique la séquence 5'UTR du messenger de p53 ayant le premier codon initiateur muté + le début de la région codante (codons 1-40). Cette région correspond à ce que nous appelons l'IRES\*2.

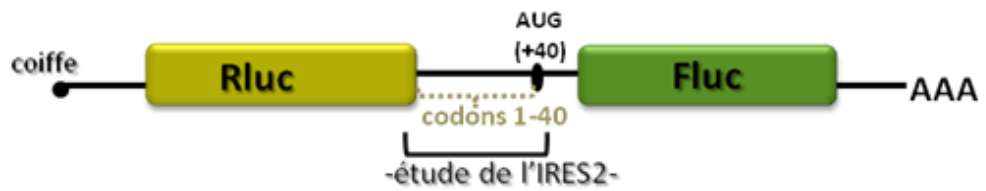
**B.** Dans notre étude, le vecteur utilisé pour étudier l'IRES2 de p53 contient dans la région intercistronique uniquement le début de la région codante (codons 1-40) du messenger de p53.



### A. Etude de Das



### B. Notre étude



#### 4.2.2.2 L'étude de Fahraeus ne permet pas de mettre en évidence une activité IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53

En appui à nos résultats, le groupe de Fahraeus [196] mentionne qu'il n'a jamais réussi à mettre en évidence une activité IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53 ou dans sa région codante, en utilisant le système bicistronique à deux luciférases. Les auteurs ne donnent aucun détail sur leurs expériences. Ils mesurent par contre l'expression de p53 et de son isoforme  $\Delta Np53$  et décrivent comment cette expression est modulée en différentes conditions de stress. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome éliminait l'effet de ces conditions de stress sur la stabilité de p53.

Les auteurs utilisent aussi un autre système pour étudier la traduction de p53 et de son isoforme. Leur vecteur contient la séquence codant pour la protéine GFP (green fluorescent protein) comme premier cistron, la séquence codant pour p53 comme second cistron et la région intercistronique est constituée par les premiers 120 nucléotides de la région codante de p53. Aussi, une tige-boucle précède cette région pour empêcher tout effet d'une réinitiation ou d'une translecture. Les auteurs observent une expression de p53 et de son isoforme, qui n'est pas affectée par l'ajout de la région 5'UTR de l'ARNm de p53 en amont des premiers 120 nucléotides. Leurs données ne nous permettent pas d'évaluer l'importance de cette expression et nous pensons qu'il s'agit d'une expression résultant d'événements alternatifs conduisant à une très faible expression de p53. Dans aucun cas, les auteurs ne nous montrent la stimulation de l'activité du présumé IRES dans la région codante de p53 par rapport à un contrôle négatif sans IRES mais préfèrent procéder par comparaison entre conditions normales et conditions de stress. Les auteurs du groupe de Fahraeus soulignent d'ailleurs qu'ils ne peuvent pas affirmer que leurs observations démontrent l'existence d'un IRES au début de la région codante de p53, sur la base de l'absence de résultats avec le vecteur à deux luciférases et aussi diverses contradictions entre les données qu'ils obtiennent *in vitro* et dans les cellules en culture. Notons aussi que leurs résultats impliquent que leur présumé IRES peut initier la traduction en amont et non seulement en aval puisqu'ils produisent à la fois p53 et son isoforme  $\Delta Np53$ .

### **4.2.3 Absence de certains contrôles lors de l'évaluation des activités des régions présumées IRES dans l'ARNm de p53**

Aucunes des études mentionnées dans la littérature, en lien avec les régions IRES de p53, ne présentent des données avec des contrôles SERI, mais montrent dans la majorité des cas qu'il y a une activité significative par rapport à un contrôle négatif sans IRES. Les essais avec des séquences SERI ont été effectués dans l'étude des IRES viraux (par exemple, l'IRES du VHC [161]) et ces SERI n'avaient pas d'activité par rapport aux IRES correspondants. Nous pensons qu'il s'agit de contrôles importants car si les activités IRES observées résultent en fait d'événements anormaux se produisant avec une très faible probabilité, il est possible que cette probabilité soit semblable pour les SERI, ce que nous avons d'ailleurs observé.

Un autre contrôle important à faire est de comparer l'expression de Fluc résultant d'un présumé IRES à celle de l'expression de Fluc résultant d'une traduction coiffe-dépendante. Si la traduction via un présumé IRES ne représente qu'un très faible pourcentage de la traduction coiffe-dépendante, il est douteux de croire qu'elle serait importante pour compenser pour l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante. Ces contrôles sont généralement omis dans les études portant sur les IRES des messagers cellulaires.

Il serait possible que les IRES soient dormants en conditions normales mais stimulés en situation de stress. Une étude réalisée par un seul groupe avait mentionné qu'une augmentation de l'activité IRES dans le 5'UTR du messenger de p53 accompagne la sénescence, celle du groupe de Ruggero [185]. La section suivante examine rapidement ces travaux.

#### **4.2.4 Critique de l'étude de l'activité IRES de p53 (en 5'UTR) dans la sénescence**

Le groupe de Ruggero [185] avait identifié une transition de la traduction coiffe-dépendante vers la traduction IRES-dépendante contrôlant l'expression de p53 durant la sénescence. Les auteurs de cette étude ont d'abord observé une augmentation de l'ARNm codant pour p53 dans les polysomes et ont proposé de relier cet effet à une stimulation de l'activité IRES contenue dans la région 5'UTR du messenger de p53. Leur système d'étude pour évaluer l'activité IRES de p53 est le système habituel à deux luciférases. Contrairement à nous, le groupe de Ruggero observe une augmentation de 2.5 fois dans l'expression de la Fluc à partir des vecteurs transfectés dans des fibroblastes de souris (MEF) où la sénescence est induite par l'oncogène Ras. Mais les auteurs montrent aussi les détails de la variation de l'expression de Rluc et Fluc, durant l'établissement de la sénescence, qui indiquent que c'est principalement la diminution de Rluc qui explique l'augmentation apparente de l'activité IRES évaluée par le rapport Fluc/Rluc. Cette augmentation se manifeste 7 jours après infection, mais non avant, alors que l'expression de p53 est déjà augmentée dans les cellules 4 jours après infection avec Ras. Les auteurs ne montrent jamais la valeur de l'IRES par rapport à un contrôle négatif, mais on peut supposer que c'est une valeur équivalente à celle que nous avons observée, tout comme les groupes de Das et de Yang. Cela signifie que la valeur de l'activité du prétendu IRES stimulée ne pourrait guère expliquer la stimulation de la synthèse de p53 en conditions de stress. Nos résultats lancent un doute très sérieux sur l'existence de deux régions dans l'ARNm de p53 ayant une activité IRES.

L'initiation de la traduction via un IRES a été longtemps le seul mécanisme d'initiation coiffe-indépendante communément accepté en réponse aux stress cellulaires, changements de conditions environnantes ou infections virales [114,140,214]. Toutefois, les résultats de notre étude et le réexamen de la littérature concernant les IRES de p53 nous amène à investiguer davantage ce qui est connu dans la littérature actuelle au sujet des IRES des messagers cellulaires.

## **4.3 Controverse concernant les IRES des messagers cellulaires**

Il a été observé qu'un faible nombre de messagers cellulaires (moins de 10%) pouvaient être traduits même lorsque l'initiation coiffe-dépendante était inhibée [215]. Cette affirmation se basait sur des travaux de Johannes et Sarnow qui ont analysé à l'aide de micropuces les messagers présents dans les polysomes de cellules soumises à des conditions inhibant la traduction coiffe-dépendante. Il a été conclu que ces messagers devaient être traduits via un IRES. Un nombre croissant d'IRES a été ensuite mis en évidence dans les messagers cellulaires, généralement en utilisant le vecteur à deux luciférases, choisi pour sa grande sensibilité. Toutefois, des voix méfiantes se sont alors faites entendre, montrant que l'activité de ces prétendus IRES résultaient plutôt de la présence d'un promoteur cryptique ou bien d'un épissage cryptique avec le système bicistronique utilisé pour évaluer l'activité de ces IRES.

### **4.3.1 Critiques au sujet d'une activité IRES dans les messagers cellulaires**

Une première revue importante critiquant ces IRES a été publiée par Kozak en 2005 [216]. Cependant, comme Kozak avait précédemment critiqué aussi l'existence des IRES dans les messagers viraux [217], ses critiques ne reçurent pas toute l'attention requise. Plus récemment, des revues détaillées de Jackson [206] et de Shatsky et son équipe [211] arrivent aux mêmes conclusions que Kozak [216,218,219] et réfutent la plupart des IRES trouvés dans les messagers cellulaires. De nombreux IRES déclarés dans la littérature sont en fait dus à la présence d'un promoteur cryptique ou d'un site cryptique d'épissage [206,207]. Tel est le cas des messagers cellulaires de BiP, XIAP, Apaf-1, VEGF, RUNX2, La, c-Myc, HIF-1a, où l'existence des IRES a été infirmée [211].

Ce qui ressort en fait de ces revues critiquant les IRES des messagers cellulaires est en parfait accord avec nos résultats sur les présumés IRES de p53. De plus, ces revues suggèrent que les contrôles généralement utilisés ne suffisent pas. Il faut y ajouter un contrôle examinant l'importance de l'activité dite IRES par rapport à l'activité coiffe-dépendante et un contrôle négatif correspondant à la région inversée ou bien la région complémentaire (que nous avons nommé contrôle SERI). Comme nous l'avons discuté dans la section 4.2.3 en lien avec les IRES

de p53, si l'activité d'un prétendu IRES est semblable à celle du SERI, on peut supposer qu'elle provient d'un événement aléatoire. Aussi, si l'activité IRES est très faible par rapport à celle de l'initiation coiffe-dépendante, il est évidemment douteux de penser qu'elle puisse jouer un rôle important dans la traduction. Il est surprenant que de tels contrôles aient été systématiquement omis et que toute une littérature sur les IRES des messagers cellulaires se soit développée, en leur absence.

### **4.3.2 Caractéristiques des IRES des messagers viraux par rapport aux IRES des messagers cellulaires**

On peut s'interroger sur ce qui différencie un véritable IRES comme un IRES viral des prétendus IRES des messagers cellulaires. Rappelons que ces IRES ont une activité importante (100 à 300 fois la valeur d'un contrôle négatif) dans les systèmes biscistroniques [220-223].

Une remarque importante concernant les IRES des messagers cellulaires par rapport aux IRES viraux porte sur leur structure. Les vrais IRES ont des éléments structuraux secondaires et tertiaires très spécifiques. D'ailleurs, les IRES viraux sont classifiés selon leur séquence et leur structure secondaire en trois grandes familles. Les IRES intergéniques des dicistrovirus chez les invertébrés, l'IRES du VHC et ceux qui comportent des motifs semblables et les picornavirus qui sont constitués de plusieurs sous-groupes [206]. La majorité des IRES cellulaires des mammifères ont été retrouvés dans les messagers présentant un 5'UTR long et structuré et qui codent pour des protéines régulatrices de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la différenciation etc. [224]. Les chercheurs avaient déduit que ces IRES jouent un rôle crucial dans des situations où la traduction coiffe-dépendante est inhibée. Cependant, tous les IRES cellulaires découverts comportent des structures secondaires très différentes et, par conséquent, ils ne peuvent pas être regroupés par classe [149].

L'activité des IRES viraux étudiés est très affectée par une mutation même ponctuelle, bien que la structure secondaire de l'IRES ne change que très peu ou pas du tout. Quant aux présumés IRES des messagers cellulaires, l'activité ne change guère lorsqu'on fait des mutations dans divers sites [206,211].

### 4.3.3 Le saut du ribosome

Nous avons précédemment mentionné l'existence de promoteur cryptique ou d'épissage à des sites cryptiques comme événements conduisant à la production de transcrits qui peuvent générer Fluc sans recourir à un IRES. Un troisième événement anormal pouvant contribuer aussi à l'expression de Fluc à partir du système bicistronique à deux luciférasas sans impliquer un IRES est le saut du ribosome. Tel que mentionné dans l'Introduction (section 1.6.3), dans le modèle du saut, la sous-unité ribosomique 40S est recrutée à l'aide des facteurs canoniques d'initiation au niveau de la coiffe en 5' de l'ARNm et balaye le messenger à la rencontre d'un codon initiateur dans le bon contexte, tout comme dans le modèle classique du balayage. Lorsque la 40S rencontre des structures secondaires très stables durant le balayage du messenger, elle peut sauter pour atterrir plus loin, et continuer alors le balayage, jusqu'à l'atteinte du codon initiateur. Bien que jusqu'à présentement le mécanisme du saut des ribosomes ait été rencontré chez les messagers viraux, il y a deux cas connus chez les messagers cellulaires [160,161]. Nous pensons que cet événement est susceptible de se produire avec une faible efficacité lors de la traduction des messagers bicistroniques provenant de nos constructions et contribuer à la production d'un peu de Fluc.

Une étude en 2008 rapporte un premier cas de saut des ribosomes rencontré chez les messagers cellulaires, soit le messenger de la protéine inhibitrice de l'apoptose cIAP2 qui est traduit exclusivement via le mécanisme du saut des ribosomes tant en conditions normales qu'en conditions de stress [161]. Son ARNm contient un 5'UTR structuré et long de 2.83 kbases et 64 codons AUG initiateurs précédant l'AUG initiateur authentique. Cette étude nous suggère que le saut du ribosome pourrait aussi être un mécanisme d'initiation alternatif important dans la production de certaines protéines. Nous pensons aussi que des sauts accidentels des ribosomes pourraient se produire lors de la synthèse des protéines, tout comme nous l'avons suggéré avec nos constructions bicistroniques.

#### **4.3.4 Traduction des ARN messagers dans différentes conditions de stress**

L'existence des IRES dans les messagers cellulaires est douteuse. Par contre, ce qui ne fait pas de doute, c'est que certains messagers sont mieux traduits en conditions de stress. C'est le cas de p53 [56,196]. D'une manière générale, c'est le cas d'autres protéines impliquées notamment dans l'apoptose, la croissance, les dommages à l'ADN etc. [215]. Ces messagers sont traduits sans nécessiter eIF4E, la protéine liant la coiffe. Face aux critiques multiples portant sur les IRES cellulaires, d'autres mécanismes commencent à être proposés, expliquant comment certains messagers peuvent être traduits sans eIF4E. La section suivante présente le principal de ces modèles.

### **4.4 Modèle du recrutement des ribosomes via des éléments internes (CITE)**

#### **4.4.1 Premières évidences d'une initiation de la traduction possible en absence des facteurs liant la coiffe**

Gunnery et al. [225] ont observé une traduction efficace des ARN transcrits par la polymérase III, connue pour produire des ARN sans coiffe. Ensuite, d'autres études indiquent la stimulation de la traduction des ARNm *in vitro* par le facteur eIF4G dépourvu de son extrémité N-terminale, et donc de son site de liaison pour eIF4E, ou bien le recrutement de ribosomes par eIF4F alors que eIF4E n'est pas lié à la coiffe [226,227]. Récemment, l'étude de Andreev et al. [207] sur les 5'UTR des différents messagers a montré que le ribosome reconnaît l'extrémité 5' du messenger du facteur Apaf-1, se lie et balaye le messenger jusqu'à la rencontre d'un codon initiateur, même en absence de l'interaction entre eIF4E et la coiffe. Bien que la stimulation de la traduction dans ce cas soit indépendante des protéines liant la coiffe, l'extrémité 5' de l'ARNm semble être importante pour la traduction. Les auteurs de cette étude concluent que certains ARNm comportent des structures capables de favoriser la traduction indépendamment de la coiffe et des protéines liant la coiffe, mais qu'il ne se s'agit pas d'une initiation IRES-dépendante.



#### **4.4.2 Modèle d'initiation de la traduction via les structures CITE chez les virus de plantes**

Chez une grande partie des virus de plantes, l'ARNm ne contient pas de coiffe. Le mécanisme proposé pour la traduction de ces messagers viraux implique des structures spécifiques identifiées CITE (*Cap Independent Translation Enhancers*) [228,229]. La majorité d'éléments CITE découverts dans les messagers viraux se trouvent en 3'UTR (nommés 3'CITE) et ils sont connus pour recruter des éléments nécessaires pour le recrutement de la machinerie traductionnelle et la conduire en 5' du messager via l'interaction des régions 5'UTR et 3'UTR. On connaît dans la littérature que les 3'CITE peuvent recruter le complexe eIF4F soit via l'interaction avec eIF4E, eIF4G ou les deux, ou bien le recrutement direct de la sous-unité 60S ou du ribosome 80S (voir revue [211]). Bien que les éléments CITE en 5' du messager soient moins connus et caractérisés, de nombreux 3'CITE peuvent exercer également leur fonction de recrutement du ribosome lorsqu'ils sont ajoutés en 5'UTR du messager en l'absence de la coiffe [230-232].

#### **4.4.3 Le domaine J-K de l'IRES de EMCV peut agir comme un élément d'initiation interne CITE chez les messagers cellulaires, en dehors du contexte d'IRES**

Les travaux de Shatsky [221] révèlent plusieurs éléments-clés qui nous amènent à la théorie des sites internes CITE en ce qui concerne l'initiation de la traduction de l'ARNm de p53. Dans un premier temps, les auteurs montrent que la longueur et la structure du 5'UTR d'un messager n'interfèrent pas avec l'initiation de la traduction via la coiffe [207]. Les auteurs étudient ensuite le domaine J-K de l'IRES d'EMCV, connu pour lier le facteur d'initiation eIF4G [233]. Ce domaine a été ajouté dans la région 5'UTR des messagers de la  $\beta$ -globine et de L1 [221]. L1 est un élément mobile, retrotransposon de la famille LINE, très répandu dans le génome des mammifères [234]. Le 5'UTR de L1 est très long (~900 pb), structuré et riche en bases GC (60% de GC). L'intérêt des auteurs pour l'ARNm de L1 est dû à l'efficacité de traduction des protéines à partir d'un si long et structuré messager. L'ajout du domaine J-K en amont du 5'UTR de la  $\beta$ -globine ou bien suivant le 5'UTR du messager L1 révèle clairement une

augmentation de l'activité traductionnelle indépendante de la coiffe mais dépendante de l'extrémité 5'. De plus, la présence du domaine J-K en 5'UTR des messagers L1 et  $\beta$ -globine en conditions de stress cellulaire ou de compétiteurs de la coiffe, rend la synthèse du gène rapporteur plus résistante au stress qu'en absence du domaine J-K. Cette étude propose pour une première fois un mécanisme de recrutement des ribosomes chez les messagers cellulaires via le domaine J-K en dehors du contexte de l'IRES de EMCV, tout comme le font les éléments CITE des virus des plantes.

Le modèle du recrutement des ribosomes via des éléments CITE chez les messagers viraux, tout comme l'étude récente de Shatsky [221] montrant une stimulation de la traduction via le domaine J-K de l'IRES de EMCV et indépendamment des protéines liant la coiffe, nous suggèrent qu'un nouveau mécanisme de traduction coiffe-indépendante serait envisageable. Le modèle d'initiation de la traduction via un élément CITE en 5'UTR en comparaison avec l'initiation coiffe-dépendante ou IRES-dépendante est illustré dans la figure 4-4. Des éléments en 5'UTR des messagers ou des protéines liant ces structures pourraient recruter (avec une affinité plus faible que les vrais IRES viraux) et augmenter la concentration des facteurs d'initiation ou même de la sous-unité 40S à l'extrémité 5' du messager. Également, l'interaction entre les régions UTR des messagers cellulaires pourrait créer un élément CITE important pour le contrôle de la traduction spécifique des messagers en conditions de stress.

**Figure 4-4. Mécanismes d'initiation de la traduction de protéines chez les eucaryotes.**

Adapté d'après l'article de Shatsky, 2013[221]

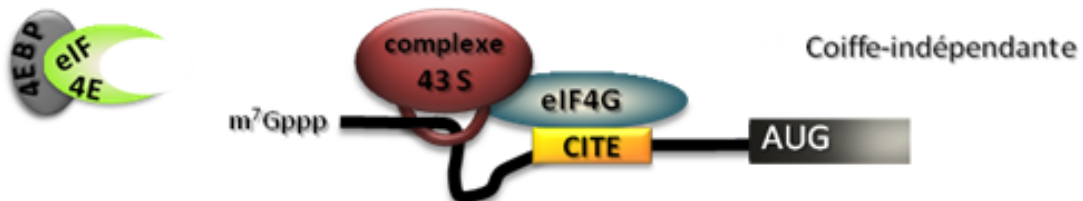
A.

Dans le modèle d'initiation coiffe-dépendante, le ribosome interagit avec eIF4G présent à l'extrémité 5' pour avoir accès à l'ARNm.



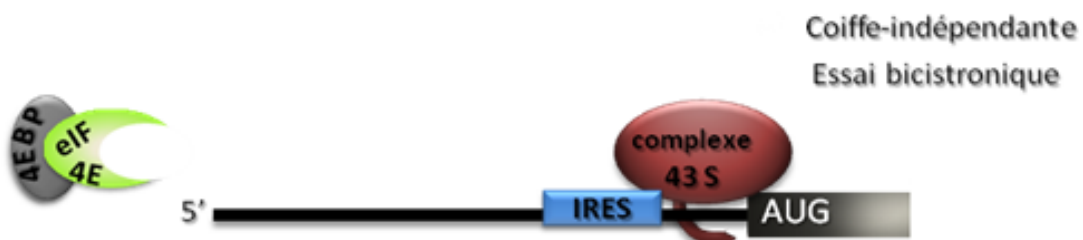
B.

Chez les ARNm ayant un élément interne (CITE), le ribosome est attiré par l'eIF4G présent au niveau de l'élément CITE mais il entre uniquement par l'extrémité 5' de l'ARNm.



C.

Chez les ARNm ayant un site d'entrée interne (IRES), le ribosome est recruté par ce site pour être sur l'ARNm.



## **4.5 Éléments CITE issus possiblement d'une interaction entre les régions 5'UTR-3'UTR**

### **4.5.1 Ce qu'on connaît de la régulation de l'expression génique via l'interaction des régions 5'-3' du messenger**

La régulation de la traduction des protéines impliquant des éléments se trouvant dans les régions 5'UTR ou 3'UTR est bien connue et documentée dans la littérature chez les eucaryotes [235,236]. Ces régions peuvent recruter des facteurs régulateurs de la traduction [237] ou des courts ARN non-codants [238,239], ou former des structures secondaires qui interfèrent avec les ribosomes [125,240]. Le contrôle de la traduction via l'interaction des régions en 5' et en 3'UTR peut aussi jouer un rôle chez les messagers des protéines RNP qui circularisent en favorisant l'interaction entre la coiffe et la queue poly(A) et qui sont stabilisés par des facteurs d'initiation de la traduction (eIF3, eIF4E, eIF4G)[120,125,241]. La circularisation du messenger favorise dans ce cas la traduction coiffe-dépendante.

Quant au contrôle spécifique de la traduction de protéines via l'interaction 5' et 3'UTR de leurs messagers, cela est déjà très connu chez les bactéries [242] et chez les virus[243], mais moins chez les eucaryotes. Un exemple connu de contrôle spécifique de la traduction via l'interaction des régions UTR est chez le messenger du virus du nanisme jaune de l'orge (BYDV) dont l'ARNm forme une boucle suite à l'interaction directe des deux régions UTR en l'absence des facteurs d'initiation de la traduction [244]. On pourrait spéculer qu'un mécanisme semblable pourrait réguler la traduction du messenger de p53 en conditions de stress.

#### **4.5.2 Interaction entre les régions 5'UTR et 3' UTR chez l'ARNm de p53**

Chen et Kastan [245] ont identifié récemment un mécanisme de régulation de la traduction de p53 qui dépend de l'interaction entre les régions 5'UTR et 3'UTR du messenger de p53. Cette interaction conduit à la formation d'un site de liaison pour la protéine RPL26 qui stimule la traduction du messenger de p53. Des analyses structurales avec le logiciel RNAfold révèlent la présence d'une structure d'ARN double brin contenant entre 18-21 paires de bases provenant de l'interaction 5'UTR et 3'UTR. En comparant les structures prédites du messenger de p53 chez l'humain avec les messagers d'autres espèces telles que le poisson zèbre, les amphibiens, les rongeurs ou les primates, les auteurs trouvent que les régions appariées sont très semblables et donc possiblement conservées [245]. Puisque ces régions sont conservées dans les messagers de différentes espèces, elles devraient être importantes pour le contrôle de l'expression de p53. Nous pensons que l'interaction entre les régions UTR de p53 pourrait créer un site d'initiation interne nommé CITE qui favoriserait une traduction coiffe-indépendante.

#### **4.6 L'expression des gènes est plus versatile qu'on le pensait**

Tout au long de notre étude sur les présumés IRES du messenger de p53 dans le système bicistronique, nous avons rencontré plusieurs problèmes, au niveau de la traduction (réinitiation, translecture, saut des ribosomes, promoteur cryptique) mais également des problèmes au niveau de l'épissage. En effet, le système à deux luciférases nous a permis de mettre en évidence qu'il y aurait beaucoup plus d'erreurs dans l'expression des gènes qu'on le pensait. Ces événements accidentels conduisent à petite échelle à une grande diversité de protéines. Mais globalement, on peut supposer que ces accidents ont un impact important sur l'expression génique. En appui à cette hypothèse, Schubert et al. [246] ont montré que dépendamment de conditions, au moins 30 à 60% de protéines nouvellement synthétisées sont dégradées par le protéasome. On pourrait alors s'interroger sur la raison pour laquelle la cellule n'a pas évolué de manière à optimiser l'expression génique en éliminant ce système coûteux en énergie. Nous supposons que le couplage du ribosome au protéasome favoriserait un recyclage plus rapide des acides aminés et augmenterait leur disponibilité dans le milieu intracellulaire pour la synthèse de protéines.

## Conclusion et Perspectives

Le but de mon projet de recherche était d'identifier les éléments-clés modulant l'activité des IRES dans l'ARNm de p53 et ensuite d'étudier leur comportement dans la sénescence. L'étude des IRES de p53 a été réalisée dans les lignées cellulaires HEK293T et IMR90 exprimant de manière transitoire ou stable le système bicistronique à deux luciférases séparées par la région IRES d'intérêt. Bien qu'il ait été suggéré que l'augmentation de p53 en conditions de stress cellulaires serait due entre autres à la stimulation de l'activité de deux IRES se trouvant dans la région 5'UTR et le début de la région codante du messager de p53, notre étude ne nous a pas permis de constater la présence d'un IRES dans l'ARNm de p53.

Un réexamen de la littérature sur les IRES de p53 et sur les IRES cellulaires en général nous a permis de confirmer les données obtenues. Nous avons pu constater également que plusieurs articles remettent en question l'existence des IRES dans les messagers cellulaires. Toutefois, nous n'excluons pas la possibilité que certains messagers cellulaires soient traduits via une initiation interne IRES-dépendante.

Notre étude ainsi que le réexamen de la littérature nous a permis de constater qu'un autre modèle d'initiation, alternatif à la traduction classique coiffe-dépendante rencontrée chez les messagers eucaryotes, existe chez les messagers viraux de plantes, dépourvus de coiffe. Le modèle implique des éléments présents en 3'UTR de l'ARNm (des CITE), capables de recruter la machinerie traductionnelle et son transfert en 5' du messager via l'interaction des régions UTR. Ce mécanisme d'initiation est dite coiffe-indépendante, mais non IRES-dépendante. Puisque la traduction joue un rôle important dans l'induction optimale de p53 en conditions de stress et puisque l'interaction entre les régions UTR du messager de p53 est conservée chez plusieurs espèces, nous avons proposé que l'interaction des régions UTR du messager de p53 puisse constituer un élément CITE important pour la régulation de la traduction de p53 en conditions de stress cellulaire. L'étude de la régulation de la traduction de p53 est importante pour comprendre le mécanisme de régulation comme suppresseur de tumeurs mais aussi son implication dans le vieillissement.

Le système à deux luciférases utilisé dans notre étude nous a permis de plus de mettre en évidence qu'il y aurait beaucoup plus d'erreurs dans l'expression des gènes qu'on le pensait. Globalement, ces événements accidentels pourraient avoir un grand impact sur la traduction ainsi que sur la consommation d'énergie dans la cellule. Il reste à déterminer la raison pour laquelle ce système versatile a été préservé dans la cellule.



## Bibliographie

1. Organisation Mondiale de la Santé. 10 faits sur le vieillissement et la qualité de vie. Faits et chiffres. Avril 2012. Consulté le 28 Janvier 2014.  
<http://www.who.int/features/factfiles/ageing/fr/index.html>
2. Organisation Mondiale de la Santé. Faits marquants sur le vieillissement. Consulté le 28 janvier 2014. <http://www.who.int/ageing/about/facts/fr/index.html>
3. Balducci L, Ershler WB (2005) Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nat Rev Cancer* 5: 655-662.
4. Cairns J (1981) The origin of human cancers. *Nature* 289: 353-357.
5. Loeb LA, Harris CC (2008) Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res* 68: 6863-6872.
6. Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323.
7. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
8. Maslon MM, Hupp TR (2010) Drug discovery and mutant p53. *Trends Cell Biol* 20: 542-555.
9. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
10. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001008.
11. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
12. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-1238.
13. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, et al. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445: 656-660.
14. Kastan MB (2007) Wild-type p53: tumors can't stand it. *Cell* 128: 837-840.
15. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, et al. (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445: 661-665.

16. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI (2006) Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127: 1323-1334.
17. Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9: 749-758.
18. Zuckerman V, Wolynec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y (2009) Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 219: 3-15.
19. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, et al. (2002) "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21: 6225-6235.
20. Dumble M, Moore L, Chambers SM, Geiger H, Van Zant G, et al. (2007) The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* 109: 1736-1742.
21. Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, et al. (2004) Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 18: 306-319.
22. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebraniou N, et al. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415: 45-53.
23. Rovinski B, Munroe D, Peacock J, Mowat M, Bernstein A, et al. (1987) Deletion of 5'-coding sequences of the cellular p53 gene in mouse erythroleukemia: a novel mechanism of oncogene regulation. *Mol Cell Biol* 7: 847-853.
24. Feng Z, Levine AJ (2010) The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol* 20: 427-434.
25. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D (2007) Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 35: 7475-7484.
26. Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JH (2008) Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet* 24: 77-85.
27. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, et al. (2009) DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8: 311-323.
28. Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U (2007) Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 128: 36-44.

29. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311: 1257.
30. Kishi S (2004) Functional aging and gradual senescence in zebrafish. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 521-526.
31. Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, Halloran KM, Grimm P, et al. (2003) Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int* 63: 2134-2143.
32. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367.
33. Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.
34. Hastay P, Sharp ZD, Curiel TJ, Campisi J (2013) mTORC1 and p53: clash of the gods? *Cell Cycle* 12: 20-25.
35. Blagosklonny MV (2012) Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)* 4: 159-165.
36. Collado M, Serrano M (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10: 51-57.
37. Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192: 547-556.
38. Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, et al. (2009) Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell* 16: 115-125.
39. Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, et al. (2009) Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* 15: 255-269.
40. Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, et al. (2006) A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 10: 459-472.

41. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, et al. (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725-730.
42. Coppe JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, et al. (2011) Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 286: 36396-36403.
43. Vaziri H, Benchimol S (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8: 279-282.
44. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
45. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.
46. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-198.
47. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.
48. Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, et al. (2009) Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 15: 294-303.
49. Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, Boxer RB, Moody SE, et al. (2007) Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9: 493-505.
50. Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, et al. (2007) A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 21: 379-384.
51. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633-637.

52. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444: 638-642.
53. Moiseeva O, Mallette FA, Mukhopadhyay UK, Moores A, Ferbeyre G (2006) DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol Biol Cell* 17: 1583-1592.
54. Jackson JG, Pereira-Smith OM (2006) p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res* 66: 8356-8360.
55. Somasundaram K (2000) Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 5: D424-437.
56. Yang DQ, Halaby MJ, Zhang Y (2006) The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* 25: 4613-4619.
57. Ray PS, Grover R, Das S (2006) Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep* 7: 404-410.
58. Reinhardt HC, Schumacher B (2012) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* 28: 128-136.
59. Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581.
60. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (1989) In *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed. Oxford University Press. Oxford.: 416–508.
61. Hu HL, Forsey RJ, Blades TJ, Barratt ME, Parmar P, et al. (2000) Antioxidants may contribute in the fight against ageing: an in vitro model. *Mech Ageing Dev* 121: 217-230.
62. von Zglinicki T (2000) Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 908: 99-110.
63. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, et al. (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274: 7936-7940.

64. Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125: 1241-1252.
65. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16: R551-560.
66. von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27: 339-344.
67. Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS (1998) Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci* 854: 155-170.
68. Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J, Ladhoff J, Jeyapalan J, et al. (2004) Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J Biol Chem* 279: 17826-17833.
69. Fripiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, et al. (2001) Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 2531-2537.
70. Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, et al. (1998) Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 332 ( Pt 1): 43-50.
71. Chen Q, Ames BN (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4130-4134.
72. Rai P, Onder TT, Young JJ, McFaline JL, Pang B, et al. (2009) Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 169-174.
73. Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C (1989) Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 7: 149-159.
74. D'Autreaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813-824.
75. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, et al. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275: 1649-1652.

76. Reddy MM, Fernandes MS, Salgia R, Levine RL, Griffin JD, et al. (2011) NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. *Leukemia* 25: 281-289.
77. Lassegue B, Griendling KK (2010) NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 653-661.
78. Kim KS, Choi HW, Yoon HE, Kim IY (2010) Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* 285: 40294-40302.
79. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, et al. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-724.
80. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour CM, et al. (2010) A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* 5: e9188.
81. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979.
82. Ksiazek K, Jorres A, Witowski J (2008) Senescence induces a proangiogenic switch in human peritoneal mesothelial cells. *Rejuvenation Res* 11: 681-683.
83. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, et al. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6: 2853-2868.
84. Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, et al. (2006) The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* 66: 794-802.
85. Kang MK, Kameta A, Shin KH, Baluda MA, Kim HR, et al. (2003) Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res* 287: 272-281.
86. Millis AJ, Hoyle M, McCue HM, Martini H (1992) Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp Cell Res* 201: 373-379.

87. Provinciali M, Barucca A, Cardelli M, Marchegiani F, Pierpaoli E (2010) Inflammation, aging, and cancer vaccines. *Biogerontology* 11: 615-626.
88. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12072-12077.
89. Bhatia B, Multani AS, Patrawala L, Chen X, Calhoun-Davis T, et al. (2008) Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *Int J Cancer* 122: 1483-1495.
90. Liu D, Hornsby PJ (2007) Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67: 3117-3126.
91. Williams PD, Day T (2003) Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence. *Evolution* 57: 1478-1488.
92. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, et al. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19: 2122-2137.
93. Janicke RU, Graupner V, Budach W, Essmann F (2009) The do's and don'ts of p53 isoforms. *Biol Chem* 390: 951-963.
94. Yang Y, Li CC, Weissman AM (2004) Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 23: 2096-2106.
95. Mirza A, Wu Q, Wang L, McClanahan T, Bishop WR, et al. (2003) Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene* 22: 3645-3654.
96. Wahl GM, Carr AM (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 3: E277-286.
97. Hansen R, Oren M (1997) p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr Opin Genet Dev* 7: 46-51.
98. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299.
99. Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420: 25-27.



100. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299-303.
101. Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.
102. Giaccia AJ, Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12: 2973-2983.
103. Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ, Jr. (1993) Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol* 13: 4242-4250.
104. Maltzman W, Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4: 1689-1694.
105. Xu Y (2003) Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* 10: 400-403.
106. Appella E, Anderson CW (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268: 2764-2772.
107. Bai L, Zhu W-G (2006) p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* 2(4): 141-153.
108. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, et al. (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252: 1708-1711.
109. Ko LJ, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10: 1054-1072.
110. Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB (2005) Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123: 49-63.
111. Hinnebusch AG (1994) Translational control of GCN4: an in vivo barometer of initiation-factor activity. *Trends Biochem Sci* 19: 409-414.
112. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, et al. (2002) Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 22: 7405-7416.
113. Deng J, Harding HP, Raught B, Gingras AC, Berlanga JJ, et al. (2002) Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol* 12: 1279-1286.

114. Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 318-327.
115. Holcik M, Sonenberg N, Korneluk RG (2000) Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* 16: 469-473.
116. Pestova TV, Lorsch JR, Hellen CUT (2007) The mechanism of translation initiation in eukaryotes, in: C.S.H.L Press (Ed.), *Translation Control in Biology and Medicine*, John Inglis, New York.: 87-128.
117. Schofield BR, Cant NB (1996) Origins and targets of commissural connections between the cochlear nuclei in guinea pigs. *J Comp Neurol* 375: 128-146.
118. Suzuki Y, Ishihara D, Sasaki M, Nakagawa H, Hata H, et al. (2000) Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries. *Genomics* 64: 286-297.
119. Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 827-835.
120. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2007) New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell* 28: 721-729.
121. Preiss T, M WH (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25: 1201-1211.
122. Hershey JWB, Merrick WC The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, editors. *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. p. 33–38.
123. Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.
124. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 113-127.
125. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745.
126. Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23: 3200-3207.

127. Schneider R, Agol VI, Andino R, Bayard F, Cavener DR, et al. (2001) New ways of initiating translation in eukaryotes. *Mol Cell Biol* 21: 8238-8246.
128. Jackson R (2000) A comparative view of initiation site selection mechanisms. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB. . *Translational Control of Gene Expression* Cold Spring Harbour Press, NY: 127-184.
129. Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.
130. Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, et al. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62: 2636-2643.
131. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism *J. Virol. Journal of Virology* 67: 3338-3344.
132. Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, et al. (2001) The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* 75: 181-191.
133. Herbreteau CH, Weill L, Decimo D, Prevot D, Darlix JL, et al. (2005) HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol* 12: 1001-1007.
134. Deffaud C, Darlix JL (2000) Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J Virol* 74: 11581-11588.
135. Vallejos M, Ramdohr P, Valiente-Echeverria F, Tapia K, Rodriguez FE, et al. (2010) The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res* 38: 618-632.
136. Kim DY, Woo KC, Lee KH, Kim TD, Kim KT (2010) hnRNP Q and PTB modulate the circadian oscillation of mouse Rev-erb alpha via IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 38: 7068-7078.
137. Kim TD, Woo KC, Cho S, Ha DC, Jang SK, et al. (2007) Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian melatonin production. *Genes Dev* 21: 797-810.

138. Coldwell MJ, Mitchell SA, Stoneley M, MacFarlane M, Willis AE (2000) Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* 19: 899-905.
139. Holcik M, Lefebvre C, Yeh C, Chow T, Korneluk RG (1999) A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* 1: 190-192.
140. Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE (2008) Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100: 27-38.
141. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, et al. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7029-7036.
142. Hellen CU, Sarnow P (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15: 1593-1612.
143. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12: 67-83.
144. Pestova TV, Lomakin IB, Hellen CU (2004) Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* 5: 906-913.
145. Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P (2000) Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* 102: 511-520.
146. Komar AA, Hatzoglou M (2005) Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* 280: 23425-23428.
147. Lewis SM, Holcik M (2008) For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* 27: 1033-1035.
148. Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE (2005) Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ* 12: 585-591.
149. Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M (2006) Searching for IRES. *RNA* 12: 1755-1785.
150. Kozak M (1988) Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. *Mol Cell Biol* 8: 2737-2744.

151. Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N (2000) A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5: 607-616.
152. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ (2002) Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* 13: 1792-1801.
153. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, et al. (1998) Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 18: 3112-3119.
154. Creancier L, Mercier P, Prats AC, Morello D (2001) c-myc Internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Mol Cell Biol* 21: 1833-1840.
155. Hohn T, Corsten S, Dominguez D, Futterer J, Kirk D, et al. (2001) Shunting is a translation strategy used by plant pararetroviruses (Caulimoviridae). *Micron* 32: 51-57.
156. Futterer J, Kiss-Laszlo Z, Hohn T (1993) Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Cell* 73: 789-802.
157. Pooggin MM, Ryabova LA, He X, Futterer J, Hohn T (2006) Mechanism of ribosome shunting in Rice tungro bacilliform pararetrovirus. *RNA* 12: 841-850.
158. Curran J, Kolakofsky D (1988) Scanning independent ribosomal initiation of the Sendai virus X protein. *EMBO J* 7: 2869-2874.
159. Yueh A, Schneider RJ (1996) Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev* 10: 1557-1567.
160. Yueh A, Schneider RJ (2000) Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* 14: 414-421.
161. Sherrill KW, Lloyd RE (2008) Translation of cIAP2 mRNA is mediated exclusively by a stress-modulated ribosome shunt. *Mol Cell Biol* 28: 2011-2022.
162. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963.
163. Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273: 14002-14007.

164. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, et al. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371: 762-767.
165. Beretta L, Svitkin YV, Sonenberg N (1996) Rapamycin stimulates viral protein synthesis and augments the shutoff of host protein synthesis upon picornavirus infection. *J Virol* 70: 8993-8996.
166. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34: 7-11.
167. Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ (2000) Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ* 7: 603-615.
168. Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271-274.
169. Terenin IM, Dmitriev SE, Andreev DE, Shatsky IN (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 836-841.
170. Pestova TV, de Breyne S, Pisarev AV, Abaeva IS, Hellen CU (2008) eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *EMBO J* 27: 1060-1072.
171. Vyas J, Elia A, Clemens MJ (2003) Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA* 9: 858-870.
172. Tinton SA, Schepens B, Bruynooghe Y, Beyaert R, Cornelis S (2005) Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha. *Biochem J* 385: 155-163.
173. Gerlitz G, Jagus R, Elroy-Stein O (2002) Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* 269: 2810-2819.
174. Myasnikov AG, Simonetti A, Marzi S, Klaholz BP (2009) Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr Opin Struct Biol* 19: 300-309.

175. Skabkin MA, Skabkina OV, Dhote V, Komar AA, Hellen CU, et al. (2010) Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev* 24: 1787-1801.
176. Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE, Ivanov PA, Dunaevsky JE, et al. (2010) GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem* 285: 26779-26787.
177. Doudna JA, Sarnow P (2007) Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. In *Translational Control in Biology and Medicine*, M. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press). p. 129–154.
178. Fernandez J, Yaman I, Sarnow P, Snider MD, Hatzoglou M (2002) Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J Biol Chem* 277: 19198-19205.
179. Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108: 545-556.
180. de Haro C, Mendez R, Santoyo J (1996) The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J* 10: 1378-1387.
181. Fernandez J, Yaman I, Merrick WC, Koromilas A, Wek RC, et al. (2002) Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *J Biol Chem* 277: 2050-2058.
182. Kuyumcu-Martinez NM, Van Eden ME, Younan P, Lloyd RE (2004) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* 24: 1779-1790.
183. Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, et al. (1998) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18: 334-342.
184. Blaszczyk L, Ciesiolka J (2011) Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry* 50: 7080-7092.
185. Bellodi C, Kopmar N, Ruggero D (2010) Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *EMBO J* 29: 1865-1876.

186. Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, et al. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J* 14: 4442-4449.
187. Gajjar M, Candeias MM, Malbert-Colas L, Mazars A, Fujita J, et al. (2012) The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell* 21: 25-35.
188. Grover R, Ray PS, Das S (2008) Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle* 7: 2189-2198.
189. Chen J, Guo K, Kastan MB (2012) Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J Biol Chem* 287: 16467-16476.
190. Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A (2001) Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 76: 17-29.
191. Fukushi S, Okada M, Stahl J, Kageyama T, Hoshino FB, et al. (2001) Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 276: 20824-20826.
192. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, et al. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274: 948-953.
193. Venot C, Maratrat M, Sierra V, Conseiller E, Debussche L (1999) Definition of a p53 transactivation function-deficient mutant and characterization of two independent p53 transactivation subdomains. *Oncogene* 18: 2405-2410.
194. Zhu J, Zhou W, Jiang J, Chen X (1998) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* 273: 13030-13036.
195. Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fahraeus R (2002) p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 4: 462-467.
196. Candeias MM, Powell DJ, Roubalova E, Apcher S, Bourougaa K, et al. (2006) Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene* 25: 6936-6947.
197. Joerger AC, Fersht AR (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77: 557-582.



198. Chiang MF, Chou PY, Wang WJ, Sze CI, Chang NS (2013) Tumor Suppressor WWOX and p53 Alterations and Drug Resistance in Glioblastomas. *Front Oncol* 3: 43.
199. Carter MS, Sarnow P (2000) Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites. *J Biol Chem* 275: 28301-28307.
200. Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, Brakier-Gingras L, Heveker N (2006) Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 345: 127-136.
201. Ferbeyre G (2002) PML a target of translocations in APL is a regulator of cellular senescence. *Leukemia* 16: 1918-1926.
202. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
203. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24: 596-601.
204. Gendron K, Ferbeyre G, Heveker N, Brakier-Gingras L (2011) The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res* 39: 902-912.
205. Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB (2007) *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Monograph Series 48.
206. Jackson RJ (2013) The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
207. Andreev DE, Dmitriev SE, Terenin IM, Prassolov VS, Merrick WC, et al. (2009) Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res* 37: 6135-6147.
208. Mardanova ES, Zamchuk LA, Ravin NV (2008) Contribution of internal initiation to translation of cellular mRNAs containing IRESs. *Biochem Soc Trans* 36: 694-697.
209. Van Eden ME, Byrd MP, Sherrill KW, Lloyd RE (2004) Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA* 10: 720-730.

210. Baril M, Brakier-Gingras L (2005) Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* 33: 1474-1486.
211. Shatsky IN, Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE (2010) Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells* 30: 285-293.
212. Sharathchandra A, Lal R, Khan D, Das S (2012) Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol* 9: 1429-1439.
213. Grover R, Sharathchandra A, Ponnuswamy A, Khan D, Das S (2011) Effect of mutations on the p53 IRES RNA structure: implications for de-regulation of the synthesis of p53 isoforms. *RNA Biol* 8: 132-142.
214. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ (2010) Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 254-266.
215. Johannes G, Carter MS, Eisen MB, Brown PO, Sarnow P (1999) Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13118-13123.
216. Kozak M (2005) A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* 33: 6593-6602.
217. Kozak M (2001) New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol Cell Biol* 21: 1899-1907.
218. Kozak M (2007) Some thoughts about translational regulation: forward and backward glances. *J Cell Biochem* 102: 280-290.
219. Kozak M (2008) Faulty old ideas about translational regulation paved the way for current confusion about how microRNAs function. *Gene* 423: 108-115.
220. Licursi M, Christian SL, Pongnopparat T, Hirasawa K (2011) In vitro and in vivo comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression. *Gene Ther* 18: 631-636.

221. Terenin IM, Andreev DE, Dmitriev SE, Shatsky IN (2013) A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent. *Nucleic Acids Res* 41: 1807-1816.
222. Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM (1997) Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res* 25: 925-932.
223. Bert AG, Grepin R, Vadas MA, Goodall GJ (2006) Assessing IRES activity in the HIF-1 $\alpha$  and other cellular 5' UTRs. *RNA* 12: 1074-1083.
224. Vagner S, Galy B, Pyronnet S (2001) Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2: 893-898.
225. Gunnery S, Maivali U, Mathews MB (1997) Translation of an uncapped mRNA involves scanning. *J Biol Chem* 272: 21642-21646.
226. Ali IK, Jackson RJ (2001) The translation of capped mRNAs has an absolute requirement for the central domain of eIF4G but not for the cap-binding initiation factor eIF4E. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 377-387.
227. De Gregorio E, Baron J, Preiss T, Hentze MW (2001) Tethered-function analysis reveals that eIF4E can recruit ribosomes independent of its binding to the cap structure. *RNA* 7: 106-113.
228. Miller WA, Wang Z, Treder K (2007) The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochem Soc Trans* 35: 1629-1633.
229. Kneller EL, Rakotondrafara AM, Miller WA (2006) Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* 119: 63-75.
230. Shen R, Miller WA (2004) The 3' untranslated region of tobacco necrosis virus RNA contains a barley yellow dwarf virus-like cap-independent translation element. *J Virol* 78: 4655-4664.
231. Meulewaeter F, Van Montagu M, Cornelissen M (1998) Features of the autonomous function of the translational enhancer domain of satellite tobacco necrosis virus. *RNA* 4: 1347-1356.
232. Wang S, Browning KS, Miller WA (1997) A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J* 16: 4107-4116.

233. Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* 273: 18599-18604.
234. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35: 501-538.
235. Pickering BM, Willis AE (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16: 39-47.
236. Kuersten S, Goodwin EB (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4: 626-637.
237. Standart N, Jackson RJ (1994) Regulation of translation by specific protein/mRNA interactions. *Biochimie* 76: 867-879.
238. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934.
239. Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 20: 1709-1714.
240. Gray NK, Hentze MW (1994) Regulation of protein synthesis by mRNA structure. *Mol Biol Rep* 19: 195-200.
241. Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A (2008) Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453: 1276-1280.
242. Franch T, Gulyaev AP, Gerdes K (1997) Programmed cell death by hok/sok of plasmid R1: processing at the hok mRNA 3'-end triggers structural rearrangements that allow translation and antisense RNA binding. *J Mol Biol* 273: 38-51.
243. Edgil D, Harris E (2006) End-to-end communication in the modulation of translation by mammalian RNA viruses. *Virus Res* 119: 43-51.
244. Guo L, Allen EM, Miller WA (2001) Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA. *Mol Cell* 7: 1103-1109.
245. Chen J, Kastan MB (2010) 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev* 24: 2146-2156.

246. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, et al. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770-774.