#### Université Bordeaux 2-Victor Segalen U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

### 2010

#### N° 82

Thèse pour l'obtention du

### DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du

## MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de PHARMACIE SPÉCIALISÉE

Présentée et soutenue publiquement Par **Valérie GLORIAN-SCHMITT** Née le 05 février 1981 à Armentières

Le 12 novembre 2010

# Etude de la régulation post-trancriptionnelle de l'expression de la petite GTPase *rhoB* sous UV

Directeur de Thèse **Pr Gilles FAVRE** 

JURY

Pr Gilles FAVRE Dr Niclolas SEVENET Dr Jean Marie CANONGE Dr Daniel TOVAR Président

#### REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Gilles Favre de m'avoir acceuillie dans son laboratoire, où j'ai bénéficié d'un environnement agréable et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et mon tuteur d'internat.

Je remercie le Dr. Nicolas Sevenet et le Dr. Jean-Marie Canonge, pour l'honneur que vous me faites en acceptant de lire et d'évaluer mon travail.

Je remercie le Dr. Daniel Tovar pour avoir accompagné mes premiers « pas » dans la recherche, en m'encadrant pour mon M2R et également pour l'honneur que tu me fais de juger mon travail.

Je remercie le docteur Stephan Vagner pour m'avoir guidé dans mes réflexions et mes expériences scientifiques.

Je remercie l'ensemble du service de Biochimie de la faculté de pharmacie de Toulouse qui m'ont permis de découvrir l'enseignement au cours de mon monitorat, et plus particulièrement le Pr. Sophie Doisneaux-Sixou, le Dr. Isabelle Lajoie–Mazenc et le Pr Bettina Couderc pour m'avoir fait partager votre passion de l'enseignement.

Je remercie l'ensemble des membres actuels, ainsi que ceux qui ont fait partis des équipes de l'U563 de l'institut Claudius Regaud, pour les services rendus, les conseils scientifiques et pour l'ambiance du laboratoire.

Merci à mes amis, mes parents et ma belle-famille

Merci à Antonin pour ta confiance, tes encouragements et ton soutien quotidien.

#### TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	9
I. LA PETITE GTPASE RHOB	9
I.1. Structure de la petite GTPase RhoB et ses conséauences sur sa localisation	
I.2. Rôle de RhoB dans la réponse au stress cellulaire	
I.2.1. Implication de RhoB dans la réponse aux chimiotoxiques	
I.2.2. Implication de RhoB dans la réponse aux UV	13
I.2.3. Implication de RhoB dans la réponse aux radiations ionisantes et à l'hypoxie	14
I.3. Rôle de RhoB dans l'oncogénèse	15
I.4. Régulation de l'expression de RhoB	16
<i>I.4.1.</i> Présentation de la structure du gène <i>rhoB</i>	16
I.4.2. Régulation de l'expression de RhoB en réponse à des stress cellulaires	16
I.4.3. Régulation de l'expression de RhoB dans les tumeurs	
II. GENERALITES SUR LA REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GENES A	U NIVEAU
CYTOPLASMIQUE	19
II.1. Les étapes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes	19
II.2. Coordination de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel	20
II.3. Les éléments cis présents sur les ARNm et intervenant dans la régulation post-	
transcriptionnelle de l'expression des gènes au niveau cytoplasmique	22
II.4. Les facteurs trans intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle cytopla	smique
de l'expression des gènes	24
II.4.1. Les protéines de liaison aux ARNm	24
II.4.1.1. Présentation des RNA-BP impliquées dans la régulation de la stabilité ou de la dégrada	tion des
ARNm	24
II.4.1.2. Présentation des RNA-BP impliquées dans la régulation de la traduction	
II.4.1.5. Regulation des RNA-BP par des modifications post-traductionnelles et leurs consequer	1ces sur 33
II.4.2. Les microRNA	
II.4.2.1. Biogénèse des microRNA	
II.4.2.2. Argonaute 2 : une protéine effectrice essentielle de la voie des microRNA	38
II.4.2.3. La spécificité de liaison des microRNA sur leurs ARNm cibles	39
II.4.2.4. Fonction des microRNA dans la régulation de l'expression des gènes	40
<i>II.4.3.</i> Les interconnections entre les différents facteurs <i>trans</i>	
II.4.3.1. Regulation croisée de l'expression des facteurs trans.	4244
II.4.3.3. Régulation de l'activité d'un microRNA ou de la localisation cellulaire de la miRNP par	une RNA-
BP	
III. REGULATION DE LA TRADUCTION SOUS UV	
III.1. Inhibition de la traduction aénérale des ARNm sous UV	
III.1.1. Inhibition de l'expression de certains facteurs canoniques de la traduction sous UV par la p	rotéine
TIAR	46
III.1.2. Régulation de la formation du complexe ternaire eiF2-GTP-ANRt met par phosphorylation d	e eIF2α
sous UV	47
III.1.3. Régulation de la formation du complexe d'initiation de la traduction elF4F sous UV	
111.2. Mécanismes cytoplasmiques post-transcriptionnels permettant à certains gènes	de
résister à l'inhibition générale de la traduction sous UV	50
III.2.1. Rôle de séquences ou de structures spécifiques situées dans la région 5'UTR des ARNm dan	ıs la
regulation de la traduction selective des AKNm sous UV	50 auo doc
gènes sous IIV	400 005 52
OBJECTIFS DE L'ETUDE	54
RESULTATS	56
I. RHOB RESISTE A L'INHIBITION GENERALE DE LA TRADUCTION SOUS UV	

II. LA REGION 3'UTR DE RHOB EST IMPLIQUEE DANS LA REGULATION TRADUCTIONNELLE DE	RHOB SOUS
UV	
III. UNE REGION CONTENANT A LA FOIS LE SITE DE FIXATION DE HUR ET LE SITE PUTATIF DE F	FIXATION DE
MIR-19 EST REQUISE POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE RHOB SOUS UV	60
IV. HUR ET MIR-19 REGULENT NEGATIVEMENT L'EXPRESSION DE RHOB	61
V. HUR ET MIR-19 SONT IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE RHOB SOUS UV	
VI. MIR-19, EN REGULANT L'EXPRESSION DE RHOB, PARTICIPE A LA REPONSE AUX DOMMAGES	s a l'ADN
SOUS UV, EN REGULANT L'APOPTOSE	
MATERIEL ET METHODE	66
I. CULTURE CELLULAIRE ET IRRADIATION AUX UV	
II. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES	
III. TRANSFECTION D'OLIGONUCLEOTIDES	
IV. TRANSFECTION DE PLASMIDES ET ESSAI DE RAPPORTEUR DE GENE LUCIFERASE	
V. Western Blot	
VI. EXTRACTION ARN ET RT-QPCR	
VII. ANALYSE DU FRACTIONNEMENT DES POLYSOMES	
VIII. ANALYSE DE L'APOPTOSE PAR LA METHODE DE TUNEL	
DISCUSSION	71
REFERENCES	96

#### **TABLE DES FIGURES :**

Figure 1 : Cycle d'activation de la protéine RhoB	.10
Figure 2 : Schéma représentant la structure de la petite GTPase RhoB	.12
Figure 3 : Les complexes ribonucléoprotéines dans la coordination des étapes post-	
transcriptionnelles de l'expression des gènes	.21
Figure 4 : Représentation schématique de quelques éléments de séquence qui affectent	
l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle.	.23
Figure 5 : Représentation schématique des structures de certaines ARE-BP	.32
Figure 6 : Sites de phosphorylation de HuR par les kinases inductibles par les dommage	es à
l'ADN	.35
Figure 7 : Voie canonique de la biogénèse des microRNA	.37
Figure 8 : Domaines structuraux de la protéine Argonaute 2	.38
Figure 9 : Principe de la reconnaissance des ARNm cibles par les microRNA	.39
Figure 10 : Mécanismes de répression des gènes par les microRNA	.41
Figure 11 : Régulation croisée de l'expression des facteurs trans	.44
Figure 12 : Régulation du complexe ternaire de l'initiation de la traduction par	
phosphorylation du facteur eIF2 $lpha$	.48
Figure 13 : Liaison compétitive entre 4E-BP sous sa forme hypophosphorylée et eIF4G	
pour le site d'interaction de eIF4E	.49
Figure 14 : Représentation schématique du rôle de petits uORF dans la traduction	
spécifique des ARNm sous stress	.51
Figure 15 : Régulation traductionnelle de <i>rhoB</i> sous UV	.56
Figure 16 : Implication de la région 3'UTR de <i>rhoB</i> dans sa régulation sous UV	.58
Figure 17 : Implication d'une séquence de 98 nucléotides de longueur (de 779 à 877 nt)	)
située au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm de <i>rhoB</i> dans sa régulation aux UV.	.61
Figure 18 : HuR et miR -19 régulent négativement l'expression de RhoB	.62
Figure 19 : Régulation de l'expression de RhoB sous UV par HuR et miR-19	
Figure 20 : miR-19, en régulant l'expression de RhoB, participe la réponse apoptotique	
induite par les UV	.65
Figure 21 : Implication de HuR dans la cangérogénèse	.74

#### TABLE DES TABLEAUX :

ns la
27
67
68
69
70

#### **ABREVIATIONS :**

5-Fu	5 –Fluorouracil
ac-pré-microRNA	Ago2-cleaved-précurseur microRNA
Ago	Argonaute
AMD	ARE Mediated Decay
АМРК	AMP-activated Protein Kinase
ARE	AU-Rich Element
ARE-BP	ARE Binding Protein
ARN	Acide Ribonucleique
ARNm	Acide Ribonucleique messager
BRF	Butyrate Response Factor
CDR	Coding Determinant Region
CEBPb	CATT / Enhancer Binding Protein b
CELF	CUG-BP1 and ETR-Like Factors
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF	eukaryotic Initiation Factor
eIF4E	eucaryotic Initiation Factor 4E
ELAV	Embryonic Lethal Abnormal Vision
FTI	Inhibiteurs de Farnesyltransférase
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	Guanine nucléotide Dissociating Inhibitors
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GGTI	Inhibiteurs de GéranylGéranylTransférase
GRE	GU Rich Elément
GTP	Guanosine TriPhosphate
HDAC	Histone déacétylase
hnRNPD	Heterogeneous Nuclear RibonucleoProteinD
HNS	Novel Shuttling Sequence
IRES	Internal Ribosome Entry Site
КН	domaine K-Homologous
KSRP	K Homology-type Splicing Regulatory Protein
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MRE	MicroRNA Element Reponse

mRNP	Complexe RiboNucléoProtéique
NFĸB	Nuclear Factor kappa B
P-Bodies	Processing–Bodies
РЗ8-МАРК	P38 Mitogen Activated Protein Kinase
PARN	Poly(A) RiboNucléase
Pasha	Partner of Drosha
Pré-miRNA	Precurseur de microRNA
Pri-miRNA	Primary transcrit of miRNA
RGG	domaine riche en arginine et glycine
RhoB	Ras homolog B
RhoB-F	RhoB sous sa forme farnésylée
RhoB-GG	RhoB sous sa forme géranylgéranylée
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA-BP	RNA Binding Protein
RRM	RNA Recognition Motif
SG	Stress Granule
SHMT1	Sérine HydroxyMethyl Transférase 1
TIA-1	T-cell-restricted intracellular antigen-1
TIAR	TIA-1 related protein
TRBP	TAR RNA Binding Protein
Trn1	Transportine 1
ТТР	Tristetraprolin
uORF	Upstream Open Reading Frame
UTR	Untranslated Region
ZnF	Zinc Finger domain

### Introduction

Les analyses du génome humain et d'autres génomes d'eucaryotes supérieurs ont révélé que seule une petite fraction du matériel génétique (environ 1,5%) code pour des protéines (Lander, Linton et al. 2001; Venter, Adams et al. 2001). En effet la majorité de l'ADN génomique est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Jusqu'aux années 1980, l'intérêt des biologistes s'est porté sur la régulation transcriptionnelle des gènes. Récemment, un autre niveau de régulation de l'expression des gènes, impliquant de nombreux évènements posttranscriptionnels, a été mis en évidence. Les ARNm eucaryotes, en plus de leur cadre de lecture, contiennent des informations situées dans leurs régions non traduites, qui régissent les différentes étapes de leur métabolisme pour permettre leur synthèse protéique finale. Le contrôle de ces différentes étapes post-transcriptionelles permet de générer, de manière coordonnée, une diversité protéique nécessaire pour répondre aux différents stress environnementaux et la dérégulation de ces mécanismes est impliquée dans les processus de cancérogénèse.

Les travaux du laboratoire s'orientent plus précisément vers l'étude de la petite GTPase RhoB (Ras Homolog B), un suppresseur de tumeur, dont l'expression est dérégulée dans un certain nombre de cancers, sans que les mécanismes ne soient clairement élucidés. En effet, des études antérieures concernant la régulation transcriptionnelle de *rhoB* ne permettent pas d'expliquer la totalité des cas où l'on observe une perte d'expression de *rhoB* dans les tumeurs. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux mécanismes post-transcriptionnels régulant la petite GTPase *rhoB*, en utilisant comme modèle d'étude sa régulation sous UV.

Dans une première partie nous présenterons quelques données bibliographiques concernant la protéine RhoB, les mécanismes post-transcriptionnels régulant l'expression cytoplasmique des gènes et plus précisément le contrôle de la traduction sous UV. Nous présenterons ensuite les premiers résultats de l'étude concernant la régulation post-transcriptionnelle de *rhoB* sous UV, qui ont permis d'identifier deux facteurs post-trancriptionnels contrôlant l'expression de *rhoB* : la protéine de liaison aux ARNm HuR et le microRNA miR-19. Ces résultats seront discutés dans une troisième partie, qui abordera également les perspectives de ce travail, qui font l'objet de mes travaux de thèse d'université.

### Données bibliographiques

#### I. La petite GTPAse RhoB

La protéine RhoB appartient à la superfamille des GTPases monomoriques Ras. Cette superfamille est divisée en plusieurs familles dont la famille des protéines Rho qui contient 20 membres, répertoriés en 5 sous-familles selon des critères d'homologies de séquences et de fonctions, parmi lesquelles se trouve la sous-famille des protéines Rho, comprenant RhoA, RhoB et RhoC (Boureux, Vignal et al. 2007).

Comme les autres membres de cette famille, RhoB joue un rôle de commutateur moléculaire dans la transmission des signaux intra-cellulaires, contrôlant ainsi de nombreux processus biologiques. RhoB se présente sous deux formes : une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, conformation dans laquelle RhoB est capable d'interagir avec ses effecteurs pour déclencher différentes voies de signalisation intracellulaire. Son cycle d'activation/inactivation va être régulé par trois types de protéines régulatrices : les GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), les GAP (GTPase Activating Protein) et les GDI (Guanine nucléotide Dissociating Inhibitors)(Prendergast 2001) (Figure 1). De par son rôle dans la transmission des signaux intracellulaires, la protéine RhoB est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la formation des fibres de stress d'actine, le trafic endocytaire, le contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire, la transcription, ainsi que dans l'adhérence cellulaire et la migration.

Nous présenterons dans les paragraphes suivants la structure et les modifications posttraductionnelles de RhoB qui pourraient être impliquées dans les rôles différentiels de RhoB, étroitement liés à sa localisation cellulaire. Nous ne détaillerons pas l'ensemble des fonctions de RhoB, cité précédemment, mais nous exposerons plus précisément les deux rôles de RhoB qui présentent un intérêt particulier pour notre étude : l'implication de RhoB dans la réponse au stress cellulaire, ainsi que dans l'oncogénèse. Enfin, la structure du gène *rhoB*, ainsi que les différentes connaissances concernant la régulation de son expression seront abordées dans le dernier paragraphe.



**Figure 1 : Cycle d'activation de la protéine RhoB.** La protéine RhoB se présente sous deux formes : une forme inactive liée au GDP (bleu) et une forme active liée au GTP (rose), qui peut alors interagir avec des effecteurs. Ce mécanisme d'activation/inactivation est régulé par trois types de protéines (gris clair) : les GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui catalysent l'échange du GDP en GTP, les GAP (GTPase Activating Protein) qui stimulent l'activité GTPasique intrinsèque permettant le retour à la forme inactive et les GDI (Guanine nucléotide Dissociating Inhibitors) qui séquestrent dans le cytosol la protéine RhoB et limitent son activation par les GEFs (d'après Prendergast, 2001).

#### I.1.Structure de la petite GTPase RhoB et ses conséquences sur sa localisation

La petite GTPase RhoB est une protéine de 196 acides aminés qui présente 85 % d'homologie au niveau de sa séquence primaire avec RhoA et RhoC, la région la plus variable étant l'extrémité C-terminale (Figure 2).

La moitié de sa séquence du coté N-terminal contient la majorité des acides aminés impliqués dans la liaison et l'hydrolyse du GTP. Les acides aminés essentiels pour la fonction catalytique sont Gly 14, Thr 19, Phe 30 et Gln 63 (Figure 2(i), rectangle bleu) et sont conservés entre les trois isoformes des Rho. Les domaines « switch 1 » et « switch2 » (Figure 2 (i), rectangle rose) subissent un changement de conformation important selon la nature du nucléotide lié à la protéine, permettant ainsi l'interaction avec les effecteurs. Quelques variations de séquence entre RhoA, RhoB et RhoC sont retrouvées au niveau d'une « boucle d'insert » (Figure 2 (i), rectangle

rouge), une hélice située entre les acides aminés 123 et 136. Cet élément de structure est caractéristique de la famille des Rho mais n'est pas retrouvé au niveau de la séquence des membres de la superfamille des Ras GTPase. Aucun effecteur interagissant avec cette région n'a été identifié, pourtant la délétion de cette région influence la stabilité et le pouvoir transformant de RhoA. C'est pourquoi il est envisagé que les différences de séquences entre les trois protéines Rho au niveau de cette boucle d'insert permettent des interactions différentes avec des régulateurs spécifiques de chaque isoforme.

La région C-terminale est appelée « région hypervariable », car l'essentiel des différences de séquence primaire entre les protéines Rho est localisé au niveau de cette région de 25 acides aminés (Figure 2 (i), rectangle gris) (Wheeler and Ridley 2004). Cette région joue un rôle essentiel dans la localisation de RhoB. RhoB subit différentes modifications post-traductionnelles, initiées par une étape d'isoprénylation. L'isoprénylation consiste au greffage covalent d'un lipide isoprénique insaturé, le farnesyl ou le géranylgéranyl, sur une cystéine située en position carboxyterminale du motif consensus CAAX (C pour cystéine, A pour acide aminé aliphatique, X acide aminé quelconque) (Figure 2 (i), rectangle vert), localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Les trois derniers acides aminés (-AAX) subissent ensuite un remodelage protéolytique et la cystéine terminale est méthylée. Contrairement à RhoA et RhoC qui sont uniquement geranylgéranylées, RhoB peut être prénylée avec un groupement farnesyl de 15 carbones ou avec un groupement géranylgéranyl de 20 carbones (Baron, Fourcade et al. 2000). Cette différence a un impact sur sa localisation, qui est majoritaire au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes, alors que RhoA et RhoC sont retrouvées dans le cytoplasme ou à la membrane plasmique (Adamson, Paterson et al. 1992; Michaelson, Silletti et al. 2001). Mais quand RhoB est exclusivement géranylgéranylée (Rho-GG) par un inhibiteur de farnesyltransférase ou par mutation de son domaine C-terminal, sa localisation est alors préférentiellement vésiculaire. A l'inverse un mutant de RhoB exclusivement farnésylé (RhoB-F) est localisé principalement au niveau de la membrane plasmique (Wherlock, Gampel et al. 2004; Milia, Teyssier et al. 2005). La nature de l'isoprényl de RhoB conditionne donc sa localisation et pourrait être à l'origine des différences fonctionnelles entre RhoB-GG et RhoB-F. Enfin RhoB peut également être palmitoylée (addition réversible d'un acide palmidique par thioestérification sur un résidu cystéine) au niveau de deux résidus cystéines (Cys 189 et Cys 192). Cette modification post-traductionnelle de RhoB va aussi influencer sa localisation et sa fonction (Wang and Sebti 2005).





**Figure 2 : Schéma représentant la structure de la petite GTPase RhoB.** (i) La liaison du GTP ou du GDP (bleu) entraîne des modifications de conformation, qui vont influencer la liaison des effecteurs ou des protéines régulatrices au niveau des domaines Switch 1 et 2 (rose). Les résidus essentiels pour la liaison des effecteurs sont indiqués en violet. La région C-terminale, constituée d'une région appelée hypervariable (gris) et de la séquence CAAX (vert), joue un rôle important pour la localisation de RhoB au niveau des différents compartiments cellulaires. Le domaine d' « insert » des Rho (rouge) est le motif structural qui permet de distinguer les protéines Rho des autres petites GTPases. (ii) La séquence protéique de RhoB humain utilisée correspond au numéro d'accession CAA 29968-1 (Gen Bank ; NCBI). RhoB présente 90% d'homologie avec RhoA et RhoC. Les nucléotides en rouge correspondent à des différences de nucléotides entre les séquences de RhoA, RhoB et RhoC (d'après Wennerberg, 2004 et Wheeler, 2004).

#### I.2. Rôle de RhoB dans la réponse au stress cellulaire

RhoB présente des caractéristiques de gènes de réponse précoce au stress. Contrairement à RhoA et RhoC dont l'expression est constitutive, la protéine RhoB possède une demi-vie courte (une à deux heures), et son expression est induite par des facteurs de croissance ou des stress génotoxiques (Jahner and Hunter 1991; Fritz, Kaina et al. 1995; Fritz and Kaina 1997). L'implication de RhoB dans la réponse au stress cellulaire est complexe. En effet, RhoB permet de contrôler la balance des mécanismes de survie et de mort cellulaire, mais sa fonction est très dépendante du contexte cellulaire.

#### I.2.1. Implication de RhoB dans la réponse aux chimiotoxiques

Plusieurs études montrent que RhoB participe à une réponse cellulaire aux dommages à l'ADN en sensibilisant les cellules transformées à la mort cellulaire programmée, aussi appelée apoptose, causée par des agents alkylants ou certaines drogues cytotoxiques (Fritz and Kaina 2000; Liu, Cerniglia et al. 2001). Les études de Liu montrent que les fibroblastes embryonnaires de souris MEF *rhoB* -/- transformés par l'adénovirus E1A muté pour Ras, résistent à l'arrêt du cycle

cellulaire en G2/M et à l'apoptose induite par la doxorubicine. Cependant, il est intéressant de noter que, dans cette même étude, la délétion de *rhoB* dans des fibroblastes primaires normaux n'a pas d'effet sur l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN (Liu, Cerniglia et al. 2001). Cela suggère que l'effet de RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN est dépendant du contexte tumoral. L'hypothèse selon laquelle RhoB sensibilise les cellules tumorales aux agents chimiotoxiques est confortée par de récents travaux qui montrent que l'expression de RhoB est diminuée dans des cellules de carcinome humain laryngé résistantes au cisplatine (Cimbora-Zovko, Fritz et al.). RhoB joue également un rôle crucial dans la réponse apoptotique induite par des inhibiteurs de farnesyltransférase (FTI) ou par le taxol (Du and Prendergast 1999; Liu, Du et al. 2000; Liu and Prendergast 2000; Liu, Cerniglia et al. 2001). L'effet des FTI est corrélé à une augmentation de la forme géranylgéranylée de RhoB et à une modification de sa localisation cellulaire, qui est nécessaire pour l'effet apoptotique et antinéoplasique des FTI *in vitro* et *in vivo* (Liu, Du et al. 2000). RhoB est également capable de sensibiliser les cellules NIH-3T3 transformées par H-Ras au 5-Fu (Jiang, Delarue et al. 2004).

Le rôle de RhoB dans la réponse au stress cellulaire peut être expliqué en partie par son implication dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes. En effet, les études de Fritz montrent que RhoB inhibe l'activation de NF $\kappa$ B suite à un traitement par des agents alkylants dans des fibroblastes murins, *via* l'inhibition de la dégradation de d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Fritz and Kaina 2001). Les résultats du laboratoire suggèrent que seule la forme géranylgéranylée permet de bloquer l'activation des voies de survie dépendantes d'Akt et de NF $\kappa$ B (Mazieres, Tillement et al. 2005).

L'ensemble de ces résultats confère à RhoB un rôle significatif dans la réponse des cellules tumorales à l'arsenal thérapeutique anticancéreux, que sont, outre les inhibiteurs de prényltransférases, les agents génotoxiques et les poisons du fuseau.

#### I.2.2. Implication de RhoB dans la réponse aux UV

L'expression de *rhoB* est également induite par des rayonnements UV (Fritz, Kaina et al. 1995; Canguilhem, Pradines et al. 2005; Westmark, Bartleson et al. 2005). Mais le rôle de RhoB dans les mécanismes cellulaires en réponse aux UV est l'inverse de celui qu'il exerce lors d'un traitement chimiotoxique. Les résultats de Fritz, obtenus sur des cellules NIH-3T3 surexprimant la protéine RhoB, lui confèrent plutôt un rôle dans la résistance à l'apoptose induite par les UV (Fritz and Kaina 2000). Cela est confirmé par les travaux de Canguilhem qui mettent en évidence que RhoB protège les cellules de kératinocytes humains immortalisées (HaCat) de l'apoptose déclenchée par les UVB. La régulation de RhoB après exposition aux UV nécessite deux étapes : une activation précoce de la forme RhoB liée au GTP qui est indépendante de la voie de signalisation de l' EGFR, puis une induction plus tardive de l'expression de RhoB dépendante de la voie EGFR. Cette étude montre également que le rôle protecteur de RhoB sur l'apoptose induite par les UV implique une boucle de régulation entre EGFR, RhoB et la voie de survie Akt (Canguilhem, Pradines et al. 2005).

## I.2.3. Implication de RhoB dans la réponse aux radiations ionisantes et à l'hypoxie

Les résultats de plusieurs études concernant le rôle de RhoB dans l'apoptose induite par des radiations ionisantes peuvent apparaître contradictoires. Certaines de ces divergences peuvent être expliquées par l'utilisation de types cellulaires différents, ainsi que par les rôles différents attribués aux modifications post-traductionnelles de la protéine RhoB.

La première étude effectuée par l'équipe de Prendergast suggère l'implication de RhoB dans la sensibilité aux irradiations ionisantes de fibroblastes embryonnaires murins transformés par l'adénovirus EIA et par l'oncogène H-Ras. Les fibroblastes transformés rhoB -/- sont en effet plus résistants à l'apoptose induite par les radiations ionisantes que les cellules *rhoB* -/+. Ce phénotype est réversé par la réexpression ectopique de RhoB dans les cellules *rhoB* -/- (Liu, Cerniglia et al. 2001). Une étude plus récente est en accord avec ce résultat et montre que l'augmentation de l'expression de rhoB, dépendante de c-jun en réponse à des radiations ionisantes, participe à l'apoptose induite par des rayonnements ionisants dans des cellules Jurkat (Kim, Won et al.). Pourtant, des travaux menés au sein du laboratoire montrent que la petite GTPase RhoB est impliquée dans la radiorésistance cellulaire induite par l'isoforme 24 kda de FGF2 dans des cellules Hela (Ader, Toulas et al. 2002). Cet effet a été confirmé sur d'autres lignées cellulaires telles que les NIH-3T3 et les cellules de gioblastome humain U87 (Delmas, Heliez et al. 2002; Ader, Delmas et al. 2003; Milia, Teyssier et al. 2005). La surexpression de RhoB dans des lignées radiosensibles induit une augmentation de la survie après irradiation. Cet effet implique la forme farnésylée de RhoB et n'est pas dû à la régulation des mécanismes de réparation des cassures radio-induites de l'ADN, mais à une diminution de la mort post-mitotique via une prolongation de l'arrêt en G2/M et à l'inhibition de la sur-duplication des centrosomes (Milia, Teyssier et al. 2005). De plus, dans un modèle de glioblastome humain radiorésistant U87, l'inhibition de RhoB induit une radiosensibilisation in vitro et in vivo en régulant à la fois des mécanismes de survie cellulaire, mais aussi le micro-environnement tumoral (Ader, Delmas et al. 2003). RhoB joue un rôle sur l'angiogénèse en modulant l'expression et l'activité de la métalloprotéase MMP-2 et contribue à la réponse hypoxique des cellules tumorales en contrôlant la dégradation par le protéasome du facteur de transcription HiF-1 (Skuli, Monferran et al. 2006). Plus récemment, les travaux du laboratoire ont permis d'identifier une nouvelle voie contrôlant la radiorésistance des cellules

gliales, activée à la membrane par les intégrines  $I\alpha\beta3$  et  $I\alpha\beta5$  *via* la kinase régulant les intégrines ILK et RhoB (Monferran, Skuli et al. 2008).

#### I.3. Rôle de RhoB dans l'oncogénèse

Le rôle exact de RhoB dans l'oncogénèse a été l'objet de controverses. Si initialement les premiers travaux publiés lui attribuaient un rôle positif sur la transformation cellulaire (Prendergast, Khosravi-Far et al. 1995; Lebowitz, Du et al. 1997), depuis, plusieurs études s'accordent sur son rôle suppresseur de tumeurs.

Le rôle de RhoB s'est étayé avec l'étude de l'effet antitransformant des inhibiteurs de farnésyltransférase (FTI). L'équipe de Prendergast a proposé un modèle selon lequel l'effet des FTI s'explique en partie par une diminution de la forme RhoB-F, responsable de l'effet transformant, associée à une augmentation de la forme RhoB-GG aux propriétés antitransformantes. Cette modification de la balance RhoB-F/RhoB-GG serait à l'origine de l'effet des FTI, notamment sur l'inhibition de la prolifération tumorale et sur l'apoptose observées in vivo et in vitro (Lebowitz, Casey et al. 1997; Du and Prendergast 1999; Liu, Du et al. 2000; Zeng, Rane et al. 2003). Des travaux menés au sein du laboratoire ont montré que l'expression d'un mutant de RhoB exclusivement farnésylé, potentialise la transformation cellulaire des cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène H-Ras, alors que l'expression d'un mutant exclusivement géranylgéranylé, de la même manière que RhoB sauvage l'inhibe (Mazieres, Tillement et al. 2005). Cette différence d'effet entre les deux formes prénylées de RhoB n'est pas retrouvée sur des cellules NIH-3T3 non transformées. Cependant, l'importance de la forme géranylgéranylée de RhoB dans l'effet négatif de RhoB sur la transformation tumorale, n'est pas encore clairement élucidée. En effet, l'expression constitutive des formes aussi bien farnésylées que géranylgéranylées de RhoB dans différentes lignées tumorales humaines (adénocarcinome pancréatique, pulmonaire, ostéosarcome...) réverse leur phénotype transformé, favorise l'apoptose et ceci de manière indépendante du statut de Ras (Chen, Sun et al. 2000; Mazieres, Antonia et al. 2004).

En revanche, le rôle négatif de RhoB sur la progression tumorale semble maintenant établi. Cette propriété de RhoB a été corroborée par plusieurs études montrant *in vivo* et *in vitro* que la surexpression de RhoB inhibe la croissance des tumeurs et la formation de métastases (Chen, Sun et al. 2000; Jiang, Delarue et al. 2004; Jiang, Sun et al. 2004; Couderc, Pradines et al. 2008). De plus, la délétion du gène *rhoB* dans des cellules transformées augmente leur agressivité et leur capacité à former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées chez la souris. Des souris invalidées pour le gène *rhoB* présentent alors une susceptibilité accrue au développement de tumeurs chimio-

induites (Jiang, Sun et al. 2004). Des travaux plus récents ont permis de préciser le rôle de RhoB dans la progression tumorale en mettant en évidence une implication de RhoB plus importante dans les processus de migration et d'invasion que dans l'étape de l'initiation tumorale (Baldwin, Parolin et al. 2008; Bousquet, Mazieres et al. 2009; Connolly, Van Doorslaer et al.).

Enfin l'implication de RhoB dans l'oncogénèse est confortée par plusieurs études indiquant une sous-expression de RhoB dans un certain nombre de cancers, notamment dans les cancers pulmonaires où cette perte d'expression est proportionnelle au stade d'avancement de la maladie (Mazieres, Antonia et al. 2004), mais aussi dans les cancers de la sphère ORL (Adnane, Muro-Cacho et al. 2002), les glioblastomes (Forget, Desrosiers et al. 2002) et les cancers gastriques (Zhou, Zhu et al.). Les travaux de Huang établissent un lien entre RhoB et le puissant oncogène c-myc. En effet, RhoB favorise la dégradation de la protéine c-myc. Ainsi les auteurs suggèrent que la perte d'expression de RhoB, observée dans différentes tumeurs, potentialise les propriétés oncogéniques de c-myc en limitant sa dégradation (Huang, Kamasani et al. 2006).

#### I.4. Régulation de l'expression de RhoB

#### I.4.1. Présentation de la structure du gène rhoB

Le gène *rhoB* humain est situé sur le chromosome 2 (2p24) (Cannizzaro, Madaule et al. 1990). Sa région codante présente la particularité d'être dépourvue de séquence intronique. Sa région promotrice proximale présente 97% d'homologie de séquence avec la souris et le rat et est caractérisée par deux boîtes CCATT et deux boîtes TATA. Plusieurs sites de liaisons putatifs de facteurs de transcription ont été identifiés par des analyses bioinformatiques, tels que NF-Y, AP2, AP4, SP1, NFkB et PPAR (Fritz and Kaina 1997; Malcolm, Ettehadieh et al. 2003; Tovar, Faye et al. 2003). Le gène *rhoB* permet la transcription d'un ARNm présentant une très longue région 3'UTR de 1,4kb, très conservée entre les espèces, contenant de nombreuses séquences ARE (Westmark, Bartleson et al. 2005). Plusieurs facteurs *trans* se fixant au niveau de cette région ont été identifiés tels que la protéine de liaison aux ARNm HuR, et deux petits ARN non codants, miR-21 et miR-223 (Westmark, Bartleson et al. 2005; Connolly, Van Doorslaer et al. ; Sun, Li et al.).

#### I.4.2. Régulation de l'expression de RhoB en réponse à des stress cellulaires

*rhoB* est un gène de réponse précoce au stress, dont l'expression est induite par des agents endommageant l'ADN ou par des facteurs de croissance. Cette induction peut être la conséquence d'une **régulation transcriptionnelle**. En effet, une augmentation de l'activité du promoteur de *rhoB* a été observée sous UV (Fritz and Kaina 1997; Fritz and Kaina 2001; Canguilhem, Pradines et

al. 2005). Des expériences de délétions et de mutations des séquences promotrices ont permis d'identifier une région minimale de 0,7kb responsable de cette induction, contenant une boîte CCATT, sur laquelle un complexe de transcription contenant les facteurs NF-YA et ATF-2 peut interagir (Fritz and Kaina 1997; Fritz and Kaina 2001). L'induction transcriptionnelle de rhoB sous UV est indépendante des voies de signalisation JNK, ERK et de P38, mais implique l'activation de EGFR (Fritz and Kaina 1997; Canguilhem, Pradines et al. 2005). Par ailleurs, des chimiotoxiques peuvent également augmenter la transcription de *rhoB* (Jiang, Sun et al. 2004; Kim, Kim et al. ; Kim, Won et al.). Par exemple, un traitement par du diarylsulfonylurée, un agent anticancéreux en essai clinique, augmente l'activité du promoteur de rhoB par un mécanisme épigénétique mettant en jeu l'histone désacétylase HDAC1. Cet effet est dépendant de la voie de signalisation JNK (Kim, Won et al.). De même une étude met en évidence que le traitement par du FTI ou du GGTI (inhibiteur de Géranygéranyltransférase) induit également une acétylation des histones au niveau des séquences promotrices de rhoB permettant ainsi d'augmenter sa transcription (Delarue, Adnane et al. 2007). L'expression de rhoB est également augmentée par des facteurs de croissance tels que EGF, PDGF, TNF $\beta$  (Jahner and Hunter 1991; de Cremoux, Gauville et al. 1994; Nakamura, Asano et al. 1996). Dans ces premiers travaux, les auteurs ont conclu que cette induction était la conséquence d'une régulation transcriptionnelle du gène *rhoB*. Cependant, ces conclusions ne s'appuyaient que sur l'observation d'une augmentation de la quantité d'ARNm qui était inhibée par l'ajout de l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. Mais aucune expérience évaluant l'activité réelle du promoteur n'avait été réalisée. Des études récentes ont confirmé une régulation transcriptionnelle du gène rhoB pour le cas particulier d'un traitement par du TNFβ (Vardouli, Vasilaki et al. 2008; Vasilaki, Papadimitriou et al.). TNF $\beta$  permet, en effet, d'activer la voie de signalisation MEK-ERK, qui est requise pour le recrutement de smad3 (un cofacteur de transcription) au niveau d'une séquence du promoteur de rhoB, proche de la boîte CCAAT, connue pour lier le facteur de transcription NF-Y (Vasilaki, Papadimitriou et al.). En revanche, les travaux de Malcom ont montré que l'augmentation de l'expression de RhoB suite à une stimulation en sérum ou à l'EGF n'est pas la conséquence d'une augmentation de l'activité de son promoteur, mais résulte d'une stabilisation de son ARNm mettant en jeu des éléments de réponse situés dans sa région 3'UTR (Malcolm, Ettehadieh et al. 2003). Ces travaux mettent donc en évidence que des mécanismes post-trancriptionnels peuvent également réguler l'expression de rhoB. Une autre étude reporte que la dexaméthasone, un glucocorticoïde, induit une augmentation à la fois de la quantité de protéine RhoB mais aussi de son ARNm. Pourtant, des essais rapporteurs montrent que cette induction est indépendante d'une augmentation de l'activité du promoteur de rhoB, ce qui suggère que la régulation de l'expression de *rhoB* en réponse à la dexaméthasone, implique probablement des mécanismes post-transcriptionnels (Chen, Li et al. 2006).

**Enfin, la stabilité de la protéine RhoB est également régulée**. On observe une accumulation de la protéine RhoB lors d'un traitement par du TNF $\beta$ , qui est en partie la conséquence d'une inhibition de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome (Engel, Datta et al. 1998).

#### I.4.3. Régulation de l'expression de RhoB dans les tumeurs

Les premières études ayant pour objectif d'expliquer la diminution de l'expression de RhoB observée dans différentes tumeurs se sont orientées vers la recherche de délétions ou de mutations au niveau du gène *rhoB*. Mais aucune altération de ce type n'a été mise en évidence dans les différentes tumeurs humaines analysées (Adnane, Muro-Cacho et al. 2002; Fritz, Brachetti et al. 2002). Il est important cependant de noter que ces analyses se sont limitées à l'étude des séquences codantes de l'ORF du gène *rhoB*. Plus récemment, l'équipe de Sato a reporté une perte d'hétérozygotie au niveau du locus de *rhoB* dans 25 sur 62 tumeurs examinées, mais la corrélation entre la perte d'hétérozygotie et la diminution de l'expression de *rhoB* dans ces tumeurs n'a pas été analysée (Sato, Fukui et al. 2007).

Des travaux réalisés sur des lignées cellulaires tumorales suggèrent que des mécanismes épigénétiques peuvent réguler l'activité transcriptionnelle de rhoB (Wang, Yan-Neale et al. 2003; Mazieres, Tovar et al. 2007; Sato, Fukui et al. 2007). En effet, l'utilisation d'inhibiteur d'histone désacétylase (HDAC) induit une réexpression de *rhoB* dans plusieurs lignées cellulaires, contrairement aux inhibiteurs de méthyltransférase (Mazieres, Tovar et al. 2007). Cela suggère que la perte d'expression de *rhoB* observée au niveau des tumeurs n'est pas liée à une anomalie de la méthylation de son promoteur, mais plus probablement à des mécanismes d'acétylation des histones. Des travaux du laboratoire ont permis de cloner et de caractériser la région promotrice du gène *rhoB*. Contrairement au promoteur murin, le promoteur de *rhoB* possède une séquence de 34-pb répétée en tandem appelée VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) qui régule négativement l'activité transcriptionnelle de rhoB, et qui peut être régulée par des HDAC (Tovar, Faye et al. 2003; Mazieres, Tovar et al. 2007). Cette région est sujette à un polymorphisme caractérisé par un nombre variable de répétitions de la séquence VNTR. Des altérations génétiques des séquences VNTR ont été mises en évidence dans certaines tumeurs humaines mammaires par rapport aux tissus sains correspondants (14 sur 90 soit 15,5%; résultats non publiés), mais cela ne permet pas d'expliquer en totalité la diminution de l'expression de *rhoB* observée dans les tumeurs. Enfin, d'autres études suggèrent que l'expression de rhoB peut-être régulée négativement au niveau transcriptionnel par certains oncogènes tels que H-Ras, N-Ras, K-Ras, EGFR et ErB2 dans différentes lignées cellulaires (Jiang, Delarue et al. 2004; Jiang, Sun et al. 2004). L'étude de Jiang a montré notamment que l'oncogène Ras diminue l'expression de RhoB, via l'activation de la voie PI3K/Akt (Jiang, Sun et al. 2004). Pour conclure, les mécanismes responsables de la dérégulation de l'expression de RhoB dans les tumeurs ne sont pas encore bien caractérisés, dans la mesure où la plupart des hypothèses ne sont basées que sur des études cellulaires et non sur l'analyse de biopsies tumorales.

## II. Généralités sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes au niveau cytoplasmique

#### II.1. Les étapes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes

Après la transcription par l'ARN polymérase II d'un pré-ARN messager (pré-ARNm), qui contient l'information génétique, différents évènements sont nécessaires avant la synthèse finale de la protéine (Figure 3). Au cours de sa transcription, le pré-ARNm subit d'abord une maturation nucléaire qui comprend trois évènements :

- l'ajout d'une structure 7methylguanylate, appelée coiffe, au premier nucléotide de l'extémité 5' des pré-ARNm,

l'épissage des intons grâce à l'assemblage d'un complexe ribonucléoprotéique appelé
« splicéosome »,

- le clivage endonucléolytique de l'extémité 3' du pré-ARNm entre les séquences AAUAAA et des séquences G/U situées en aval, suivi de l'ajout d'une queue de poly (A) d'environ 250 résidus d'adénine

L'ARNm mature est ensuite exporté vers le cytoplasme où sa localisation, sa stabilité et sa traduction sont également régulées.

Le contrôle de ces différentes étapes joue un rôle essentiel, sous-estimé auparavant, dans la régulation à la fois qualitative et quantitative de l'expression des gènes (Hieronymus and Silver 2004). Au cœur de cette régulation, spécifique de chaque transcrit, se trouvent des complexes ribonucleoprotéiques (mRNP) constitués de l'association de protéines et petits ARN non codants. L'association des mRNP avec les pré-ARNm débute de manière co-transcriptionnelle, dès la naissance du transcrit. Les mRNP sont des complexes dynamiques au sein desquels différents facteurs s'associent et se dissocient tout au long de la vie cellulaire de l'ARNm (Moore 2005). La dynamique de restructuration des mRNP au cours de chacune de ces étapes permet un couplage physique et fonctionnel entre les différents évènements post-transcriptionnels de l'expression des gènes (Maniatis and Reed 2002). Par exemple, des facteurs impliqués dans l'épissage des introns permettent de recruter des facteurs protéiques nécessaires à la maturation en 3' des ARNm (Millevoi, Loulergue et al. 2006; Millevoi, Decorsiere et al. 2009).

#### II.2. Coordination de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel

L'expression des gènes doit être coordonnée, pour accomplir précisément différentes fonctions nécessaires à l'homéostasie cellulaire. Chez les procaryotes, les gènes impliqués dans les mêmes processus physiologiques sont regroupés physiquement au sein d'opéron d'ADN. Cette organisation génique leur permet de coordonner l'expression spatiale et temporelle de différentes protéines pour répondre rapidement et efficacement à des changements environnementaux. Cependant, l'inconvénient majeur de ce système repose sur l'impossibilité de réguler l'expression de chaque gène indépendamment les uns des autres. L'organisation du génome chez les eucaryotes est beaucoup plus complexe. La coordination de l'expression des gènes implique l'activation ou la répression de multiples sites promoteurs de transcription. Mais l'expression des gènes peut également être contrôlée au niveau post-transcriptionnelle au sein de régulons d'ARN (Keene 2007; Keene). Ce système de régulons d'ARN proposé par JD Keene repose sur la formation de complexes mRNP (Figure 1)(Keene and Tenenbaum 2002). De multiples ARNm, reliés fonctionnellement entre eux, sont régulés de manière coordonnée par la liaison de facteurs trans (protéines de liaison aux ARNm ou petits ARN non codants) qui interagissent spécifiquement avec des éléments de séquences de divers ARNm. Ainsi, une seule protéine de liaison aux ARNm ou un seul microRNA peut reconnaître la même séquence présente sur différents ARNm pour réguler de manière coordonnée leur expression. Cependant, chaque ARNm peut appartenir à deux régulons d'ARN différents, notamment lorsqu'il code pour une protéine impliquée dans différents processus cellulaires. Dans ce cas, les différents transcrits peuvent être régulés de manière indépendante. En effet, le destin d'un ARNm est orchestré par la liaison de plusieurs facteurs trans qui peuvent réguler le même ARNm de manière coopérative ou compétitive et l'impliquer ainsi dans divers processus biologiques.



**Figure 3 : Les complexes ribonucléoprotéines dans la coordination des étapes posttranscriptionnelles de l'expression des gènes**. A partir de leur synthèse dans le noyau jusqu'à leur traduction dans le cytoplasme, les ARNm sont associés à différentes protéines de liaison aux ARNm et petits ARN non codants qui forment des complexes ribonucléoprotéiques (mRNP). L'association et la dissociation des facteurs au sein de la mRNP permet de coordonner et de coupler les différentes étapes de la régulation post-transcriptionnelle des gènes comprenant la maturation du pré-ARNm, l'export nucléo-cytoplasmique ainsi que la régulation de la localisation, la stabilité et la traduction de l'ARNm.

## II.3. Les éléments *cis* présents sur les ARNm et intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes au niveau cytoplasmique

En plus des éléments de séquences présents dans la plupart des ARNm, tels que la coiffe en 5' et la queue de poly (A) en 3', qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des ARNm (Lewis, Gunderson et al. 1995), s'ajoutent des séquences spécifiques appelées **éléments** *cis*, présents uniquement dans certains ARNm. Ces éléments *cis* sont généralement localisés dans les régions non traduites 5'UTR ou 3'UTR des ARNm, plus rarement au niveau de l'ORF (Figure 4) (Mignone, Gissi et al. 2002).

Plusieurs séquences présentes dans la région 5'UTR des ARNm contrôlent les mécanismes posttranscriptionnels. Par exemple, les séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site), présentes dans certains ARNm, forment des structures secondaires qui permettent le recrutement des ribosomes lorsque l'initiation de la traduction cap-dépendante est inhibée (Stoneley and Willis 2004). Les petits cadres de lecture, appelés uORF (Upstream Open Reading Frame), situés en amont du codon initiation principal AUG, sont impliqués dans les mécanismes de réinitiation de la traduction sous certaines conditions (Vattem and Wek 2004). Des séquences riches en pyrimidine situées dans la région 5'UTR de certains ARNm sont reconnues par PTB, une protéine de liaison aux ARNm, impliquée dans la régulation de la traduction dépendante de séquences IRES (Mitchell, Spriggs et al. 2005).

D'autres motifs sont retrouvés dans la séquence codante des ARNm. Par exemple la séquence CDR (Coding Determinant Region) de l'ARNm de *c-myc* est reconnue par des protéines de liaison au CRD, qui protègent l'ARNm de *c-myc* de l'action d'endonucléases (Sparanese and Lee 2007).

Les séquences les plus décrites retrouvées dans la région 3'UTR des ARNm, sont les séquences ARE (AU-Rich Elément Séquence), qui sont riches en adénine et uridine. Ces séquences ont été initialement identifiées dans les régions 3'UTR d'ARNm codant plusieurs cytokines ou lymphokines inflammatoires (Caput, Beutler et al. 1986). Leur rôle direct dans la dégradation des ARNm a été mis en évidence par des expériences utilisant des systèmes rapporteurs dans lesquels l'insertion de la séquence ARE présente dans la région 3'UTR de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor) provoque leur dégradation (Shaw and Kamen 1986). Les séquences ARE ont une taille comprise entre 50 à 150 nucléotides et ont été regroupées en trois classes selon des critères d'homologie de séquences et de fonctions. Les séquences ARE de classe I et II contiennent plusieurs copies du motif AUUUA dispersées ou regroupées, alors que les séquences ARE de classe III sont dépourvues de ce motif mais sont caractérisées par une longue région riche en uridine (Chen and Shyu 1995; Barreau, Paillard et al. 2005). Depuis la découverte des séquences ARE, la liste des ARNm contenant ce motif a considérablement augmenté. Une analyse bioinformatique utilisant le motif de 13 nucléotides WWWUAUUUAUWW, où W peut être une adénine ou une uridine, estime que 8 à 12% du génome humain code pour des ARNm

contenant une séquence ARE (Bakheet, Williams et al. 2003). En plus de leur rôle dans l'instabilité des ARNm, les séquences ARE peuvent aussi induire la répression de la traduction. Plusieurs exemples montrent en effet que des séquences ARE sont capables de réguler la traduction d'ARNm endogènes ou de rapporteurs sans modifier la quantité d'ARNm cytoplasmique (Kruys, Marinx et al. 1989; Han, Brown et al. 1990; Grosset, Boniface et al. 2004). Il existe également des éléments de séquences appelés CPE (Cytoplasmique Polyadenylation Elément), localisés en amont du signal de polyadénylation qui régulent la traduction associée à une polyadénylation cytoplasmique de certains ARNm durant la maturation des oocytes (Charlesworth, Cox et al. 2004; Radford, Meijer et al. 2008). Enfin, d'autres séquences situées dans la région 3'UTR des ARNm, telles que les séquences riches en GU (GRE) (Kim and Gorospe 2008), les séquences riches en CU (Reimann, Huth et al. 2002) ou les sites d'interactions des microRNA, interviennent dans le contrôle de la stabilité et de la traduction des ARNm. Cette liste d'élément *cis* n'est pas exhaustive et le lecteur peut trouver des exemples supplémentaires dans les revues suivantes (Keene and Tenenbaum 2002; Mignone, Gissi et al. 2002).



**Figure 4 : Représentation schématique de quelques éléments de séquence qui affectent l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle.** La structure d'un ARNm avec sa région codante (coding sequence) et ses régions non traduites (5'UTR et 3'UTR) est représentée ci-dessus. Certains éléments de structure sont présents sur la plupart des ARNm tels que la coiffe en 5' m7G (5' 7methyl guanine) et la queue de poly(A) en 3' et jouent un rôle primordial dans le métabolisme des ARN. Certains ARNm possèdent des éléments de séquence ou de structure spécifiques, comme les structures en tiges boucles (Hairpin), les séquences IRES ou des petits cadres de lecture (uORF) dans leur région 5'UTR, qui influencent l'efficacité de la traduction. Au niveau de leur région 3'UTR, les ARNm peuvent contenir des séquences riches en AU (ARE) et des sites de fixation de microRNA qui peuvent influencer la stabilité et/ou la traduction des ARNm. D'autres séquences, comme les séquences CPE (Cytoplasmique Polyadenylation Elément), jouent un rôle dans la régulation de la traduction associée à une polyadénylation cytoplasmique (d'après Mignone 2002).

## II.4. Les facteurs *trans* intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle cytoplasmique de l'expression des gènes

La liaison de **facteurs** *trans* sur les éléments de séquences spécifiques de chaque ARNm permet d'orchestrer le destin des ARNm. Ces facteurs *trans* comprennent des protéines de liaison aux ARNm, aussi appelées RNA-BP (RNA Binding Protein) et des microRNA. Le dernier paragraphe décrit l'existence d'interconnections entre les facteurs *trans* dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

#### II.4.1. Les protéines de liaison aux ARNm

Dans le génome humain, il existe environ 500 protéines capables d'interagir avec l'ARN (Anantharaman, Koonin et al. 2002). Parmi elles, certaines sont capables de réguler plusieurs étapes post-transcriptionnelles de l'expression des gènes de manière spécifique de chaque transcrit. La structure des RNA-BP est composée de domaines structuraux responsables de leur liaison sur l'ARNm. Il existe une grande diversité de ces domaines. De plus, une protéine de liaison aux ARN est composée de multiples copies de ces différents domaines. Cela lui confère la possibilité de créer de nombreux réarrangements structuraux afin de former une surface de liaison macromoléculaire nécessaire pour sa liaison spécifique sur une séquence précise d'un ARNm. La spécificité de liaison des RNA-BP, est de plus, renforcée par des interactions protéine-protéine (Lunde, Moore et al. 2007). Nous nous focaliserons dans le paragraphe suivant, uniquement sur les protéines appartenant à la famille des ARE-BP, qui sont des protéines qui se lient préférentiellement sur des séquences ARE.

## II.4.1.1. Présentation des RNA-BP impliquées dans la régulation de la stabilité ou de la dégradation des ARNm

Les mécanismes exacts impliquant les ARE-BP dans la régulation de la dégradation et de la stabilité des ARNm ne sont pas clairement établis. La dégradation des ARNm engendrée par des séquences ARE , appelée AMD (ARE-Mediated Decay), peut faire intervenir la voie des exosomes, qui est initiée par une étape de déadénylation suivie d'une dégradation par des exonucléases dans le sens 3'-5' (Chen, Gherzi et al. 2001). Mais la voie AMD peut également être engendrée par une dégradation de la coiffe en 5', suivie d'une dégradation exonucléasique dans le sens 5'-3' au sein de structures cytoplasmiques appelées Processing-Bodies (P-Bodies) (Stoecklin, Mayo et al. 2006). Il apparaît que les ARE-BP ne sont pas des acteurs directs de la voie AMD, mais permettent le recrutement d'enzymes ou de protéines impliquées dans les différentes voies de dégradation.

En effet, des ARE-BP, telles que AUF1, BRF1, KSRP et TTP, peuvent interagir avec des composants du décoiffage, des enzymes de dégradation, des composants des exosomes, ainsi qu'avec la protéine PARN (Poly(A)RiboNuclease), impliquée dans la déadénylation des ARNm. De plus, des travaux récents montrent que les ARE-BP peuvent également être associées à des composants de la voie des microRNA notamment dans les structures cytoplasmiques telles que les P-Bodies ou les granules de stress. Cela suggère un lien possible entre la voie de dégradation AMD et celle impliquant les microRNA (von Roretz and Gallouzi 2008)

#### <u>AUF1</u>

AuF1 est aussi appelé hnRNPD (heterogeneous nuclear RiboNucleoProteinD). Son rôle majeur consiste à favoriser la dégradation de nombreux ARNm contenant des séquences ARE (Tableau 1) (Brewer 1991; Loflin, Chen et al. 1999; Sarkar, Xi et al. 2003; Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004; Raineri, Wegmueller et al. 2004; Lal, Abdelmohsen et al. 2006). Cependant, quelques études reportent une stabilisation de certains ARNm, associée à la liaison de AUF1 (Sela-Brown, Silver et al. 2000) (Xu, Chen et al. 2001). AUF1 est présent dans la plupart des cellules et est codé par un unique gène, mais il existe quatre isoformes d'AUF1 (P37<sup>AUF1</sup>; P40<sup>AUF1</sup>; P42<sup>AUF1</sup>; P45<sup>AUF1</sup>) issues d'un épissage alternatif du pré-ARNm (Wagner, DeMaria et al. 1998). AUF1 contient plusieurs motifs conservés présents dans toutes les isoformes (Figure 5) : (i) un domaine N-terminal riche en alanine, impliqué dans la dimérisation d'AUF1 (ii) deux domaines RRM distincts de reconnaissance à l'ARN (iii) un domaine riche en glutamine RGG qui intervient dans les interactions de type « protéine-protéine » (Kajita, Nakayama et al. 1995) (Zhang, Wagner et al. 1993). Les différentes isoformes d'AUF1 présentent des propriétés biologiques distinctes, comme par exemple des localisations cellulaires différentes (Arao, Kuriyama et al. 2000; Sarkar, Lu et al. 2003) ou des différences d'affinités pour la liaison aux ARN (Wagner, DeMaria et al. 1998). Elles peuvent expliquer la versatilité des fonctions d'AUF1 observée sur la régulation de la dégradation des ARNm (Xu, Chen et al. 2001).

#### Les protéines TTP et BRF

TTP (Tristetraprolin) appartient à une famille d'ARE-BP qui contient deux domaines de type « doigt de zinc », nécessaires et suffisants pour se lier sur les séquences ARE des ARNm (Lai, Carballo et al. 2000) et deux domaines d'activation aux extrémités C-terminale (CTD) et N-terminale (NTD) (Figure 5). Le domaine NTD sert de plateforme pour la liaison de plusieurs enzymes impliquées dans les voies de dégradation telles, que Xrn1, Rrp4, CCR4, et DCP2 (Lykke-Andersen and Wagner 2005; Hau, Walsh et al. 2007). Plusieurs études suggèrent que TTP joue un rôle dans la dégradation des ARNm (Tableau 1). La surexpression de TTP réduit l'expression de plusieurs ARNm contenant des séquences ARE (Lai and Blackshear 2001). De plus, chez des souris

ou des cellules, qui présentent une délétion homozygote du gène codant TTP, on observe une stabilisation de plusieurs ARNm contenant des ARE, tels que TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL10, Ier 3 (Taylor, Carballo et al. 1996; Lai, Parker et al. 2006; Stoecklin, Tenenbaum et al. 2008; Ogilvie, Sternjohn et al. 2009) . Une analyse sur puces à ADN révèle que plus de 250 ARNm sont stabilisés dans des MEF TTP (-/-) (Mouse Embryonic Fibroblast) et des expériences d'immunoprécipitation indiquent que TTP est associée à plus de 100 ARNm dans des macrophages, soulignant son rôle prépondérant dans la dégradation des ARNm (Lai, Parker et al. 2006; Stoecklin, Tenenbaum et al. 2008). Les autres membres de la famille, BRF1 et BRF2 (Butyrate Response Factor 1 et 2), sont des gènes paralogues à TTP, qui sont moins étudiés que TTP, mais jouent un rôle similaire dans la dégradation des ARNm. Une surexpression de BRF1 ou de BRF2 est associée à une diminution de la quantité de plusieurs ARNm contenant des séquences ARE (Lai, Carballo et al. 2000). De plus, on observe une diminution de la dégradation des ARNm contenant des ARNm contenant des ARE dans des cellules mutées pour BRF1 et cet effet est reversé par la réexpression ectopique de BRF1 ou de TTP (Stoecklin, Colombi et al. 2002).

#### <u>KSRP</u>

KSRP (K Homology-type Splicing Regulatory Protein) se lie sur des séquences ARE des ARNm et recrute des composants des exosomes et des enzymes de déadénylation, ce qui explique son rôle dans la dégradation des ARNm (Tableau 1) (Chen, Gherzi et al. 2001; Gherzi, Lee et al. 2004; Nechama, Peng et al. 2009). Par exemple la liaison de KSRP sur les ARNm contenant des séquences ARE, tels que ceux de *c-fos* ou *TNFa*, entraine leur dégradation (Chen, Gherzi et al. 2001). KSRP est organisée en 4 domaines de liaison aux ARN, appelés KH-domain (K Homology Domain) (Figure 5) et d'un domaine central appelé « linker » qui permet de moduler l'orientation et l'accessibilité des domaines KH, afin de faciliter leur interaction avec les ARNm contenant des séquences ARE (Garcia-Mayoral, Hollingworth et al. 2007; Garcia-Mayoral, Diaz-Moreno et al. 2008; Diaz-Moreno, Hollingworth et al.).

#### CUGBP1

CUGBP1 est une protéine qui favorise la dégradation des ARNm en se fixant spécifiquement sur des séquences riches en GU (GRE) des ARNm (Vlasova, Tahoe et al. 2008; Lee, Lee et al.). Les travaux de Moraes montrent que l'effet de CUGBP1 sur la dégradation de certains ARNm, tels que *c-fos* ou *TNF* $\alpha$ , est associé au recrutement et à l'activation de la protéine PARN, qui est responsable de la déadénylation des ARNm (Moraes, Wilusz et al. 2006).

D'autres protéines de liaison aux ARNm favorisent la stabilisation des ARNm, telles que HuR qui stabilise par exemple l'ARNm de *mkp-1* lors d'un stress oxydatif (Kuwano, Kim et al. 2008) ou la

nucléoline qui stabilise l'ARNm de *bcl-2* (Ishimaru, Zuraw et al.). Une des hypothèses possible permettant d'expliquer l'effet stabilisateur des ARE-BP est que certaines RNA-BP peuvent se fixer sur les ARNm au niveau d'une séquence ARE et empêcher la fixation d'une RNA-BP qui recrute les enzymes nécessaires pour la dégradation des ARNm (Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004; Ishimaru, Zuraw et al.).

ARE-BP	Localisation	Structure	Fonction cytoplasmique	Exemples d' ARNm	Ref (Bibliographie en annexe)
HuR	N/C	3RRM	(+) stabilisation	MKP-1 ;γ-GCSH ; SiRT-1 ; CEBPδ ; P21 ; cox-2 ; cyclin D1 ; cyclin A ; Myo D ;	[1, 2, 3 , 4 , 5-9]
			(+) traduction	P53 ; c-myc ; cytochrome c ;Prothymosin ;HiF-1α ;	[10,11,12,13, 14]
			(-) traduction	c-myc ; IGFR ; P27	[15-17]
AUF1	N/C	2RRM RGG (4 isoformes différents)	(+) dégradation	c-myc ; GM-CSF ; c-fos ; cyclin D1 ; IL3 ; GADD45	[18-23]
			(+) stabilisation	PTH ; TNFα	[24, 25]
ТТР	N et C (80 %)	2 ZnF	(+) dégradation	Pik3 ; TNFα ; IL3 ; INFγ ; Ier3 ; IL10 ; GM-CSF	[26-31]
BRF1	N et C	2 ZnF	(+) dégradation	TNFα ; IL3	[32, 33]
KSRP	N/C	4 KH	(+) dégradation	TNFα ; c-fos ; iNOS ; c- jun ; IL2 ; PTH ; LDLR ; PGK2 ; IL8	[34-40]
CUGBP2	N/C	3RRM	(-) traduction	Cox-2 ;HIF-1 ;Mcl-1	[41,42,43,44]
			(+) stabilisation	Cox-2	[45]
CUGBP1	N/C	3RRM	(+) dégradation	c-jun ; TNFα ; Smad7 ; Rnd3 ; Myod1 ;Pp1r15b	[46-48]
			(+) traduction	P21 ; C/EBPβ ;HiF1 ;cyclin D2 ; SHMT1	[42,49-53]
TIAR	N/C	3RRM	(-) traduction	eIF4A ; eIF4E ; eEF1B, c- myc ; cox-2 ; GADD45	[23, 54, 55]
TiA-1	N/C	3RRM	(-) traduction	Cytochrome C	[12]
nucleolin	N/C	4RRM RGG	(+) stabilisation	Bcl-2 ; GADD45 ; CD145	[56-59]
			(+) traduction	Sélénoprotéine (PHGX- TR1) ; MMP9	[60, 61]
			(-) traduction	P53	[62]

Tableau 1 : Présentation de quelques ARE-BP et de leurs fonctions cytoplasmiques dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

N (Nucléaire) ; C (Cytoplasmique) ; RRM (RNA Recognition Motif) ; ZnF (Zinc Finger domain) ; KH : domaine (K-homologous) ; RGG : domaine riche en arginine et glycine. Ce tableau présente une liste des ARE-BP et de leurs fonctions cytoplasmiques, qui n'est pas exhaustive.

## II.4.1.2. Présentation des RNA-BP impliquées dans la régulation de la traduction

#### <u>HuR</u>

HuR est une protéine de 37 kda, capable de se lier sur des séquences ARE, présentes le plus souvent au niveau des régions 3'UTR des ARNm (Levine, Gao et al. 1993; Ma, Cheng et al. 1996; Myer, Fan et al. 1997; Chen, Xu et al. 2002; Lopez de Silanes, Zhan et al. 2004). HuR appartient à la famille ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision), qui comprend trois autres membres, HuB, HuC et HuD qui sont exprimés préférentiellement au niveau des neurones différentiés terminaux, alors que l'expression de HuR est ubiquitaire (Antic and Keene 1997). La structure de HuR est caractérisée par trois domaines RRM (Figure 5), qui présentent une grande homologie de séquence avec les autres membres de la famille ELAV. Les domaines RRM1 et RRM2 coopèrent pour se lier sur des séquences ARE. Le dernier domaine, RRM3, permet la stabilisation du complexe RNA-protéine. Il peut, en effet, se lier à la queue de poly (A) des ARNm et est impliqué dans les interactions protéine-protéine. HuR contient également un domaine moins conservé appelé « Hinge Region » localisé entre le domaine RRM2 et RRM3. Ce domaine contient la séquence HNS «Novel Shuttling Sequence », qui confère à HuR sa capacité de faire la navette entre le noyau et le cytosol (Fan and Steitz 1998) (Hinman and Lou 2008). L'export nucléaire de HuR est engendré par son association avec la transportine 1 (Trn1) ou 2 (Trn2) (Guttinger, Muhlhausser et al. 2004; Rebane, Aab et al. 2004) ou avec les ligands nucléaires PP32 et April, qui contiennent un signal d'export nucléaire, qui est reconnu par le récepteur d'export CRM1(Brennan, Gallouzi et al. 2000; Gallouzi and Steitz 2001; Gallouzi, Brennan et al. 2003). Dans le cytoplasme, HuR a été initialement identifiée comme une protéine capable de réguler la stabilité des ARNm (Brennan and Steitz 2001), mais elle est aussi capable de réguler positivement ou négativement la traduction (Tableau 1) (Hinman and Lou 2008). Dans certains cas, HuR est associée aux polysomes (Gallouzi, Brennan et al. 2000) et peut favoriser la traduction de certains ARNm, par exemple, celle des ARNm du cytochrome C, de p53 et de la prothymosine, en se fixant sur des séquences situées dans la région 3'UTR de ces ARNm cibles et en augmentant leur recrutement vers les polysomes (Mazan-Mamczarz, Galban et al. 2003; Lal, Kawai et al. 2005; Kawai, Lal et al. 2006). Il a également été reporté que HuR favorise la traduction de l'ARNm de HiF-1 en se fixant sur des séquences situées au niveau de sa région 5' UTR (Galban, Kuwano et al. 2008). HuR peut aussi supprimer la traduction de certains ARNm. Deux mécanismes permettent d'expliquer son rôle dans la répression de la traduction de certains ARNm :

- HuR peut coopérer avec un microRNA pour réprimer la traduction d'un ARNm. En effet, une étude montre que HuR en se liant sur une séquence de la région 3'UTR de l'ARNm de *c-myc* permet le recrutement du complexe effecteur miRISC (complexe responsable de la répression de

l'expression des ARNm ciblés par des microRNA) au niveau du site de liaison du microRNA let-7 (Kim, Kuwano et al. 2009).

- HuR peut également réprimer la traduction IRES dépendante de certains ARNm tels que ceux *IGFR* ou de *P27* (Kullmann, Gopfert et al. 2002; Meng, King et al. 2005). Dans ce cas l'étude de Meng suggère que la liaison de HuR bloque l'association du complexe de pré-initiation 43S (Annexe 2) dans un état inactif (Meng, King et al. 2005).

#### Les protéines TIAR et TIA-1

Les protéines TIA-1 (T-cell-restricted Intracellular Antigen1) et TIAR (TIA-1 Related Protein) se lient préférentiellement sur des séquences riches en uridine ou riches en cytosine (Dember, Kim et al. 1996; Kim, Kuwano et al. 2007). Concernant leur structure, ces protéines contiennent trois domaines RRM du coté N-terminal et un domaine riche en glutamine dans leur partie C-terminale (Tian, Streuli et al. 1991; Kawakami, Tian et al. 1992) (Figure 5). En plus de leur rôle dans l'épissage des pré-ARNm (Forch, Puig et al. 2000) (Del Gatto-Konczak, Bourgeois et al. 2000; Le Guiner, Lejeune et al. 2001; Shukla, Dirksen et al. 2004), TIAR et TIA-1 peuvent également réprimer la traduction (Piecyk, Wax et al. 2000; Dixon, Balch et al. 2003; Kawai, Lal et al. 2006; Mazan-Mamczarz, Lal et al. 2006). Bien que ces protéines soient concentrées dans le noyau elles peuvent faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. En réponse à des stress environnementaux, TIAR et TIA-1 jouent un rôle général de répresseur de la traduction en s'associant avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4F, eIF3 (Annexe 2) et la sous-unité ribosomique 40S, pour former un complexe de pré-initiation non fonctionnel. Elles facilitent alors l'accumulation de ces complexes de pré-initiation inactifs au sein de structures cytoplasmiques appelées stress granule (SG) (Anderson and Kedersha 2002; Kedersha and Anderson 2002). En plus de leur rôle de suppresseur général de la traduction lors de stress cellulaire, TIAR et TIA-1 peuvent également réguler la traduction sélective de certains ARNm contenant des séquences ARE dans leur région 3'UTR (Tableau 1), tels que TNF $\alpha$  (Gueydan, Droogmans et al. 1999; Piecyk, Wax et al. 2000), COX-2 (Dixon, Balch et al. 2003), le récepteur β2 adrenergique (Kandasamy, Joseph et al. 2005), ou la protéine MMP3 (matrix mettaloprotéinase 13) (Yu, Cok et al. 2003) (Tableau 1).

#### CUGBP1 et CUGBP2

CUGBP1 et CUGBP2 appartiennent à la famille des protéines CELF (CUGBP1 and ETR-Like Factors) et présentent 76 % d'homologie de séquences entre elles, ainsi qu'une organisation structurale similaire comprenant 3 domaines RRM (Figure 5) (Lu, Timchenko et al. 1999; Good, Chen et al. 2000; Barreau, Paillard et al. 2006), avec un domaine « linker » contenant une séquence d'export cytoplasmique localisée entre le domaine RRM2 et RRM3 (Fujimura, Kano et al.

2008). Elles peuvent interagir avec différentes séquences spécifiques des ARNm : des séquences contenant des répétitions du motif CUG, des séquences riches en GU appelée GRE (GU Rich Elément), ainsi que des séquences ARE (Timchenko, Miller et al. 1996; Vlasova, Tahoe et al. 2008; Tsuda, Kuwasako et al. 2009; Rattenbacher, Beisang et al.). Ces deux protéines peuvent être localisées à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Timchenko, Miller et al. 1996; Ladd and Cooper 2004; Fujimura, Kano et al. 2008). Ainsi, lorsqu'elles sont localisées au niveau nucléaire, elles peuvent réguler l'épissage alternatif des pré-ARNm, alors qu'au niveau cytoplasmique, elles régulent la stabilité et la traduction des ARNm (Tableau 1) (Barreau, Paillard et al. 2006). Par exemple, CUGBP1 favorise la traduction de p21 et de C/EBP $\beta$  en se fixant sur des séquences spécifiques situées dans leur région 5'UTR (Timchenko, Welm et al. 1999; Timchenko, Iakova et al. 2001). CUGBP1 se lie à l'ARNm de  $C/EBP\beta$ , au niveau d'une séquence proche du codon d'initiation, et interagit avec les polysomes et les facteurs d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  et eiF2 $\beta$  (Annexe 2). C'est pourquoi il a été suggéré que CUGBP1 pourrait augmenter le recrutement de la sousunité 40S associée au Met-tRNA et favoriser le balayage des ribosomes lors de l'initiation de la traduction (Timchenko, Wang et al. 2005; Barreau, Paillard et al. 2006). Quant à CUGBP2, il peut se fixer sur des séquences ARE situées dans la région 3'UTR de l'ARNm de cox-2 et réprimer sa traduction (Mukhopadhyay, Houchen et al. 2003; Sureban, Murmu et al. 2007). Enfin, une étude plus récente montre que CUGBP1 et CUGBP2 sont associées à la région 3'UTR de HIF-1 $\alpha$  et répriment sa traduction dans des cellules de neuroblastomes non traitées. Mais, en réponse à une stimulation à l'insuline, les deux protéines augmentent alors la traduction de HIF-1 $\alpha$ . Cet effet est accompagné d'une élongation de queue de poly(A) de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  (Hagele, Kuhn et al. 2009). En revanche, le mécanisme exact permettant d'expliquer la réversibilité des fonctions des protéines CUG-BP sous insuline n'est pas encore déterminé.





**Figure 5 : Représentation schématique des structures de certaines ARE-BP.** Les rôles des différents domaines sont indiqués sous les flèches. Ces représentations ont été réalisées par compilation de différentes données trouvées dans les articles suivants : AUF1(Sarkar, 2003; Wagner ,1998) ; TTP , BRF1 et BRF2 (Lai, 2001;Lykke-Andersen and Wagner, 2005) ; KSRP (Garcia-mayoral, 2007; Diaz-Moreno, 2010; Gherzi,2004) ; HuR (Doller,2008; Hinman 2008) ; TIAR-TiA1 (Beck,1996; Forsch and valcarcel ,2001) ; CUG-BP (Good, 2000;Tsuda, 2009; Fujimura,2008) ; RRM (RNA Recognition Motif) avec les deux séquences conservées permettant la reconnaissance des nucléotides RNP1 et RNP2 ; ZnF (Zinc finger domain) ; KH : domaine (K-homologous) ; RGG : domaine riche en arginine et glycine ; DD : domaine de dimérisation ; Q : domaine riche en glutamine ; HNS (Novel Shuttling Sequence). La localisation de l'insertion des 11 et 17 acides aminés correspondant aux isoformes de TIA-1 et TIAR, qui résultent d'un épissage alternatif, est indiquée par les rectangles blancs.

### II.4.1.3. Régulation des RNA-BP par des modifications posttraductionnelles et leurs conséquences sur leurs localisations et leurs fonctions

Suite à des changements de conditions environnementales, des voies de signalisation sont activées et, par conséquent, les protéines de liaisons aux ARNm vont être modifiées posttraductionnellement. Ces modifications post-traductionnelles des RNA-BP influencent leur fonction, en modifiant leur localisation ou leur affinité de liaison pour les ARNm. Par exemple, les modifications post-traductionnelles de HuR, qui sont de mieux en mieux documentées, permettent d'illustrer cette notion (Figure 6).

## <u>Phosphorylation de HuR ou voies de signalisation qui influencent la localisation de</u> <u>HuR</u>

Plusieurs voies de signalisation régulent la localisation de HuR : la voie ATM/ATR/cdk1 ; la voie AMPK ; la voie impliquant les kinases PKC $\delta$  et PKC $\alpha$  ; et la voie P38 MAP Kinase.

(i) La phosphorylation de HuR sur la sérine-202 par cdk1, provoque la rétention nucléaire de HuR, par augmentation de son interaction avec la protéine 14-3-3. Sous UV, l'inhibition de cdk1 est responsable de l'accumulation cytoplasmique de HuR dans des cellules Hela, permettant à HuR de réguler ses ARNm cibles (*Prot-\alpha; MKP-1*; cyclinA; Mcl-1; Bcl2; HiF-1 $\alpha$ ) (Kim, Abdelmohsen et al. 2008).

(ii) L'inactivation de la kinase AMPK, par le suppresseur de tumeur VHI, ou lors d'un stress métabolique par une diminution de la quantité de polyamides cellulaires, est également corrélée à une relocalisation cytoplasmique de HuR et à une augmentation de l'expression de *p53* (Zou, Liu et al. 2008) (Galban, Martindale et al. 2003). Les travaux de Wang montrent également que l'activation de AMPK réduit l'accumulation cytoplasmique de HuR. Cet effet est associé à des modifications post-traductionnelles de l'importine  $\alpha$ 1 par phosphorylation sur sa sérine 105 et par acétylation sur sa lysine 22 (Wang, Yang et al. 2004).

(iii) La phosphorylation de HuR sur la sérine 221 par les kinases PKC $\delta$  et PKC $\alpha$ , lors d'une augmentation de la quantité d'ATP ou suite à une stimulation par l'angiotensine II, est également responsable de la relocalisation cytoplasmique de HuR (Doller, Huwiler et al. 2007; Doller, Akool el et al. 2008; Doller, Schlepckow et al.).

(IV) Enfin, lors de stress oxydatif ou lors d'une irradiation aux UV, la localisation cytoplasmique de HuR est la conséquence de l'augmentation de l'activité de la voie P38-MAPK (Song, Tatebe et al. 2005; Li, Si et al. 2008). Des protéines de liaisons aux ARNm, autres que HuR sont également régulées au niveau de leur localisation. Le lecteur peut trouver ainsi d'autres exemples dans la revue de A. Cammas (Cammas, Lewis et al. 2008).

#### Phosphorylation de HuR qui influence son affinité pour les ARNm

Dans certains cas, une modification post-traductionnelle de HuR augmente son affinité pour son ARNm cible. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 318 de HuR par la kinase PKCô, lorsque des cellules mésangliales humaines sont traitées par l'angiotensine II, augmente l'affinité de HuR pour l'ARNm de *cox-2* (Doller, Akool el et al. 2008). Une autre phosphorylation de HuR au niveau de la sérine 100 par la protéine kinase cdk2 lors d'une stimulation aux polyamides, est également associée à une augmentation de la liaison de HuR sur l'ARNm de *c-myc* et, par conséquent, à une augmentation de la traduction de *c-myc* (Liu, Rao et al. 2009). Curieusement, la phosphorylation de la même sérine 100 de HuR par cdk2 lors d'un stress oxydatif, provoque une diminution de la liaison de HuR sur l'ARNm de *sirt-1* (Abdelmohsen, Pullmann et al. 2007). Ce dernier exemple montre que des modifications post-traductionnelles d'une protéine de liaison aux ARNm peuvent diminuer ou augmenter l'affinité de cette protéine pour son ARNm cible, et que l'effet d'une modification post-traductionnelle sur l'affinité d'une RNA-BP pour un messager, n'est pas uniquement lié à l'acide aminé modifié, mais dépend aussi probablement de la séquence spécifique de l'ARNm cible.

### Méthylation de HuR

En plus d'être phosphorylée, une méthylation de HuR au niveau de l'arginine 217 a également été reportée, sous stimulation inflammatoire par des lipopolysaccharides. Cette méthylation de HuR par le coactivateur associé à l'arginine methyl transférase 1 (CARM1) est corrélée à une augmentation de la stabilité de l'ARNm de  $TNF\alpha$  (Li, Park et al. 2002).



**Figure 6 : Sites de phosphorylation de HuR par les kinases inductibles par les dommages à l'ADN.** Représentation schématique des domaines structuraux de HuR avec ses trois domaines RRM (Recognition RNA Motif) et son domaine central contenant la séquence HNS (Nucleocytoplasmique Shuttling Séquence) et des différents sites de phosphorylations de HuR par les différentes kinases (D'après Kim, 2010).

#### Modification de l'activité des RNA-BP par modification post-traductionnelle

Parfois une modification post-traductionnelle n'affecte ni l'affinité de la RNA-BP pour son messager cible, ni sa localisation cellulaire, mais l'activité de la protéine elle-même. Par exemple dans des cellules traitées à la rapamycine, la phosphorylation de la protéine de liaison aux ARN, hnRNPA1, par Akt, inhibe sa fonction activatrice de la traduction des IRES de *c-myc* et de la *cycline D1* et ceci sans modifier la liaison de hnRNPA1 sur ces ARNm (Jo, Martin et al. 2008).

En conclusion comme le montre le tableau 1 la fonction d'une RNA-BP est relative. En effet, une même RNA-BP peut réguler négativement ou positivement la stabilité ou la traduction des ARNm. La fonction d'une protéine de liaison aux ARNm dépend donc du transcrit lui-même et plus particulièrement des séquences spécifiques qui le caractérisent, de sa localisation, des interactions qu'elle établit avec d'autres protéines de liaison aux ARNm, ou de la liaison d'autres protéines sur son ARNm cible. La fonction d'une RNA-BP peut également être influencée par des modifications post-traductionnelles. Enfin, certaines protéines se présentent sous différentes isoformes qui peuvent avoir des fonctions distinctes (Barreau, Paillard et al. 2005).

#### II.4.2. Les microRNA

Les microRNA constituent une large famille de petits ARN non codants, dont la taille varie entre 21 et 25 nucléotides. Les microRNA, en se fixant sur des séquences spécifiques des ARNm, permettent une régulation très fine de l'expression des gènes (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008). Depuis leur découverte en 1993 chez le nématode C.elegans, plus de 800 microRNA humains ont été identifiés et plusieurs études soulignent leur impact considérable sur le transcriptome et le protéome des organismes eucaryotes, dans la mesure où un microRNA peut cibler à lui seul une centaine de gènes (Lim, Lau et al. 2005) (Baek, Villen et al. 2008; Selbach, Schwanhausser et al. 2008).

#### II.4.2.1. Biogénèse des microRNA

Les gènes codant les microRNA sont trancrits par la RNA-polymérase II ou III en transcrits primaires de microRNA (pri-microRNA) sous forme d'une structure en tige boucle, dont la longueur peut varier entre 100 à 1000 nucléotides (Ozsolak, Poling et al. 2008) (Borchert, Lanier et al. 2006). Deux processus de maturation permettent ensuite, de générer le micoRNA mature à partir du pri-microRNA (Figure 7) :

(i) Dans le noyau, les pri-microRNA sont clivés par un complexe multiprotéique appelé « microprocessor », dont le cœur est composé de Drosha, une endonucléase de type RNAse III, associée à la protéine de liaison aux ARN double brins, DGCR8 aussi appelée Pasha (Partner of Drosha). Le précurseur pré-microRNA est alors libéré sous forme d'une structure en tige-boucle de 70 nucléotides (Han, Lee et al. 2006). Il existe une classe de microRNA appelés mirtrons, qui sont codés à partir de l'intron de certains gènes et qui utilisent le mécanisme d'épissage pour contourner la maturation nucléaire par Drosha (Chan and Slack 2007). Dans les deux cas, le pre-microRNA formé est ensuite exporté activement hors du noyau par le complexe Exportine-5/RNA-GTP (Lund, Guttinger et al. 2004).

(ii) Dans le cytoplasme, la maturation du pré-microRNA est réalisée par une autre enzyme de type RNA III, appelée Dicer, et ses cofacteurs TRBP (TAR RNA Binding Protein), ainsi que par les protéines argonautes (Ago) (Hutvagner, McLachlan et al. 2001; Diederichs and Haber 2007). Un duplexe miRNA-miRNA\* d'une longueur avoisinant les 22 nucléotides est alors libéré. Un seul des deux brins du duplexe de microRNA, communément appelé le brin « guide », associé à Ago2, est incorporé au sein du complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) pour guider la répression de l'expression des messagers cibles. Le brin majoritairement incorporé est celui qui présente l'interaction à l'extrémité 5' la plus faible thermodynamiquement (Khvorova, Reynolds et al. 2003;
Hutvagner 2005). L'autre séquence miRNA\*, exclue du complexe RISC est ensuite dégradée (Schwarz, Hutvagner et al. 2003).

La biogénèse des microRNA, décrite ci-dessus, est en réalité beaucoup plus complexe. En effet, chacune de ces étapes est régulée, de manière spécifique pour chaque microRNA, par de multiples facteurs protéiques qui influencent l'efficacité de maturation des microRNA (Winter, Jung et al. 2009; Breving and Esquela-Kerscher).



**Figure 7 : Voie canonique de la biogénèse des microRNA**. Les gènes des microRNA sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II ou III en transcrits primaires (pri-microRNA). Les sructures tiges boucles de ces transcrits primaires sont alors excisées par le complexe Drosha-DGCR8 (orange) libérant les prémicroRNA, qui sont ensuite exportés du noyau par l'Exportin-5-Ran-GTP (violet). Dans le cytoplasme, les pré-microRNA sont alors maturés par clivage de leur structure en épingle par l'action de la RNAse Dicer, associée à la protéine de liaison aux ARN double brins TRBP (bleu). Un duplexe de microRNA est alors formé. Un des deux brins, le brin « fonctionnel » (en rouge) est incorporé au niveau du complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) contenant la protéine effectrice Argonaute 2 (Ago2). Ce complexe miRISC s'associe alors de manière spécifique à un ARNm cible pour réprimer son expression soit par clivage ou dégradation, soit en inhibant sa traduction. Tandis que l'autre brin (noir) est ensuite dégradé (D'après Winter, 2009).

# II.4.2.2. Argonaute 2 : une protéine effectrice essentielle de la voie des microRNA

La perte de la protéine endogène Ago2 est associée à la diminution de l'expression et de l'activité des microRNA matures (Diederichs and Haber 2007; O'Carroll, Mecklenbrauker et al. 2007; Diederichs, Jung et al. 2008). Cette observation souligne le rôle clé des protéines Argonautes dans la coordination entre la biogénèse et l'action des microRNA :

(i) La protéine Ago2 favorise le clivage endonucléolitique en 3' des pré-microRNA possédant une très grande complémentarité de séquences au niveau de leur structure tige boucle. Ce clivage précède celui réalisé par Dicer et permet d'orienter le chargement du brin 5' de ces ac-pré-microRNA (Ago2-cleaved-precursor microRNA) dans le complexe RISC (Diederichs and Haber 2007).

(ii) Les protéines Ago 2 constituent également le cœur minimum actif du complexe RISC (Rivas, Tolia et al. 2005; Hutvagner and Simard 2008).

Les protéines Argonautes, au nombre de quatre dans l'espèce humaine, ont un poids moléculaire d'environ 100 kDa et possèdent trois domaines très conservés, qui leur permettent d'interagir avec les microRNA (Figure 8) (Sasaki, Shiohama et al. 2003).



**Figure 8 : Domaines structuraux de la protéine Argonaute 2.** Le domaine PAZ (en jaune) situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (en gris) est important pour lier les microRNA au niveau de leur extrémité 3'. Le domaine PIWI (en orange), par son domaine catalytique, caractérisé par les résidus DDH (en rouge), confère à la protéine Ago2 son activité d'endonucléase. Le domaine MC (en bleu foncé), qui ressemble au domaine de liaison de la coiffe du facteur eIF4E, se situe au niveau du domaine central Mid (en bleu) et permet à la protéine Ago2 de se lier au niveau de la coiffe des ARNm pour réguler la traduction. Les résidus colorés représentent ceux qui sont conservés avec le domaine de liaison à la coiffe du facteur eIF4E (D'après Hutvagner, 2008).

Une étude protéomique, réalisée après immunoprécipitation des complexes miRNP associés à la protéine Ago2, montre que plusieurs protéines sont capables d'interagir de manière directe ou indirecte avec Ago2. Parmi elles, on trouve des hélicases, des protéines intervenant dans la voie des microRNA ou dans le métabolisme des ARNm, ainsi que des protéines de liaison aux ARNm, telles que des hnRNP. Cela suggère que des facteurs auxiliaires peuvent se lier aux protéines Ago

et modifier leurs fonctions ou leurs interactions avec les microRNA (Hock, Weinmann et al. 2007; Peters and Meister 2007). Le complexe RISC associé à Ago2 est donc un complexe dynamique dont l'activité va dépendre non seulement de son interaction avec le microRNA mature, mais aussi de sa liaison avec d'autres protéines spécifiques.

#### II.4.2.3. La spécificité de liaison des microRNA sur leurs ARNm cibles

La reconnaissance de l'ARNm cible par le microRNA est primordiale pour permettre une régulation sélective des ARNm. Elle permet de recruter le complexe RISC au niveau d'un messager spécifique, pour réguler sa traduction ou sa dégradation. Cette spécificité est permise grâce à une certaine complémentarité entre la séquence située sur l'ARNm appelée MRE (MicroRNA Response Element) et la séquence du microRNA.

Chez les plantes, l'appariement du microRNA au niveau de sa cible se fait de manière presque parfaite et est suivi du clivage endonucléolytique des ARNm (Jones-Rhoades, Bartel et al. 2006). A l'inverse, chez les métazoaires, cet appariement est rarement parfait, mais suit des règles qui ont été établies par des analyses expérimentales et informatiques et qui sont résumées dans la figure ci-dessous (Figure 9) (Doench and Sharp 2004; Grimson, Farh et al. 2007; Nielsen, Shomron et al. 2007) :



**Figure 9 : Principe de la reconnaissance des ARNm cibles par les microRNA.** Les microRNA se fixent le plus souvent au niveau des régions 3'UTR des ARNm. L'appariement des nucléotides du microRNA avec la séquence de l'ARNm doit être parfait au niveau d'une région d'ancrage appelée « Seed region » comprise entre les nucléotides 2-8 du coté de l'extrémité 5'P du microRNA (traits pleins entre les nucléotides entourés par les rectangles rouge foncé et vert). Au niveau de la séquence de l'ARNm, on retrouve le plus souvent une adénine (A) en face du nucléotide en position 1 et une adénine ou une uridine (U) en face du nucléotide en position 9 et 12 est rarement appariée et forme une boucle qui limite le clivage endonucléolytique de l'ARNm par Ago2. La séquence opposée à celle de l'extrémité 3' du microRNA doit être au moins complémentaire entre les bases 13 et 16 (rectangle orange) (D'après Filipowicz, 2008).

# II.4.2.4. Fonction des microRNA dans la régulation de l'expression des gènes

Les microRNA exercent leurs fonctions en s'associant avec les protéines de la famille Argonaute au sein du complexe RISC. Cependant, les mécanismes précis utilisés par les microRNA pour réguler l'expression des gènes ne sont pas encore clairement établis.

Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'effet répresseur des microRNA sur l'expression des gènes ont été émises :

(i) Les microRNA pourraient entraîner une terminaison précoce de la traduction par détachement des ribosomes de l'ARNm (Petersen, Bordeleau et al. 2006; Karaa, Iacovoni et al. 2009) (Figure 10 (A)).

(ii) Nottrott a émis une hypothèse alternative selon laquelle la machinerie des microRNA peut recruter une enzyme protéolytique non identifiée, qui dégrade le peptide naissant (Figure 10 (B)) (Nottrott, Simard et al. 2006). Cette hypothèse est basée sur l'observation suivante : les polypeptides naissant d'un rapporteur étiqueté Myc en position N-terminale ne sont pas détectés par immunoprécipitation des extraits polysomiques, lorsque l'ARNm rapporteur est sous le contrôle du microRNA let-7.

(iii) Un autre modèle propose que l'inhibition de la traduction engendrée par les microRNA résulte d'un blocage de l'initiation de la traduction. L'équipe de Kiriakidou a montré que le domaine central de la protéine Ago2 présente une certaine homologie avec le domaine de liaison à la coiffe du facteur eIF4E (Annexe 2). En effet, un motif MC, localisé dans le domaine central, de la protéine contient deux résidus phénylalanine (F47 et F505) indispensables à la liaison d'Ago2 au niveau de la coiffe des ARNm, mais aussi à sa fonction répressive sur la machinerie de traduction. Il propose alors un modèle dans lequel la protéine Ago2 entre en compétition avec le facteur eIF4E pour se lier à la coiffe des ARNm et inhiber leur traduction (Kiriakidou, Tan et al. 2007) (Figure 10 (C)).

(iv) Une autre étude, menée par Chendrimada, suggère que les microRNA peuvent inhiber l'initiation de la traduction par un mécanisme différent, en empêchant la liaison de la sous-unité ribosomique 60S à la sous-unité 40S. En utilisant des cellules humaines, les auteurs montrent que la protéine Ago2 se lie au facteur de traduction eIF6. eIF6 est un facteur de l'initiation de la traduction qui inhibe l'association des sous-unités 60S et 40S, pour permettre à chaque unité d'intervenir dans un nouveau cycle de traduction. Dans des cellules HeLa, l'inhibition d'eIF6 par stratégie siRNA lève l'inhibition de la traduction de gènes rapporteurs, engendrée par les miARN. Ainsi, Ago2, en interagissant avec le facteur eIF6, au sein du complexe RISC, pourrait bloquer le recrutement de la sous-unité 60S sur des ARNm contenant des sites d'interactions de microRNA



(Chendrimada, Finn et al. 2007) (Figure 10 (D)).

**Figure 10 : Mécanismes de répression des gènes par les microRNA.** (A) Inhibition par les microRNA de la post-initiation de la traduction. Les microRNA (rouge) répriment la traduction de leur ARNm cible en bloquant l'élongation de la traduction et en favorisant la dissociation prématurée des ribosomes. (B) Dégradation cotraductionnelle de la protéine naissante. Ce modèle propose que la traduction n'est pas inhibée mais plutôt que le peptide naissant est dégradé de manière cotraductionnelle.

(C-E)Inhibition de l'étape d'initiation de la traduction par les microRNA. (C) La protéine Argonaute entre en compétition avec eIF4E pour la liaison sur la coiffe (cercle bleu cyan). (D) Les protéines Argonautes pourraient recruter le facteur eIF6, qui empêche la sous unité ribosomique 60S de se lier à la sous unité 40S.(E) Les microRNA, associés à la protéine Argonaute peuvent induire la déadénylation des ARNm qui déstructure la forme circulaire de l'ARNm, nécessaire à l'efficacité de traduction. (F)Les microRNA favorisent la dégradation des ARNm en accélérant leur déadénylation ou leur décoiffage. Plusieurs protéines sont requises pour ces processus : les composants du complexe de déadénylase (CAF-1, CCR4, le complexe NOT), l'enzyme de décoiffage DCP2 (cercle bleu clair) et ses coactivateurs (cercle bleu foncé). Le complexe minimal RISC, comprenant la protéine Argonaute (jaune) et la protéine GW182 (vert) est représenté sur cette figure. Les ARNm sont représentés dans leur conformation circulaire, formée grâce à l'interaction de la protéine cytoplasmique liant la queue de poly (A) PABPC1 avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G, qui est lui même lié au facteur eIF4E qui interagit avec la coiffe des ARNm (d'après Eulalio 2008).

(v) Les microRNA ont également un rôle dans la déstabilisation des ARNm (Figure 10 (E et F). Plusieurs études révèlent que la surexpression ou la sous-expression des microRNA est corrélée à des variations de l'expression de leurs ARNm cibles (Bagga, Bracht et al. 2005; Krutzfeldt, Rajewsky et al. 2005; Lim, Lau et al. 2005; Giraldez, Mishima et al. 2006). De plus, plusieurs études montrent que les microRNA peuvent accélérer les processus de déadénylation et de décoiffage de leurs ARNm cibles, deux phénomènes primordiaux pour initier la dégradation des ARNm (Behm-Ansmant, Rehwinkel et al. 2006; Giraldez, Mishima et al. 2006; Wu, Fan et al. 2006; Eulalio, Rehwinkel et al. 2007).

Enfin, les microRNA, leurs ARNm cibles, et les protéines Argonautes sont retrouvés dans de petites structures cytoplasmiques ribonucléoprotéiques appelées P-Bodies. Les P-Bodies contiennent également de nombreux composants de la voie de dégradation des ARNm, mais sont dépourvues de ribosomes et de certains facteurs de traduction. La détection des protéines Argonautes, des microRNA et de leurs cibles dans les P-Bodies a permis de proposer un modèle selon lequel les ARNm, sur lesquels se fixent les microRNA, sont sequestrés au niveau de ces structures et sont donc séparés des structures polysomiques nécessaires pour leur traduction (Eulalio, Behm-Ansmant et al. 2007; Parker and Sheth 2007; Eulalio, Huntzinger et al. 2008).

#### II.4.3. Les interconnections entre les différents facteurs trans

Le devenir d'un ARNm ne résulte pas de l'interaction d'un unique facteur *trans*, mais de la liaison coordonnée de plusieurs facteurs protéiques ou microRNA. Les exemples développés ci-dessous illustrent l'existence d'interconnections entre ces différents facteurs et soulignent la complexité des mécanismes post-transcriptionnels dans la régulation de l'expression des gènes

#### II.4.3.1. Régulation croisée de l'expression des facteurs trans

Il existe des boucles d'autorégulation de l'expression des facteurs *trans* entre eux (Figure 11). Les travaux de Pullmann montrent que, dans des cellules Hela, l'expression des RNA-BP est influencée par des mécanismes post-transcriptionnels, mettant en jeu des interactions entre les différentes RNA-BP. Par exemple, l'expression de TIA-1 est contrôlée par HuR qui stabilise son ARNm et par TIAR qui réprime sa traduction (Pullmann, Kim et al. 2007). AUF1 est capable de réguler sa propre expression, en se liant sur deux sites de liaison présents au niveau de sa région 3'UTR (Wilson, Sun et al. 1999; Banihashemi, Wilson et al. 2006).

L'expression des RNA-BP peut également être régulée par des microRNA. Par exemple, l'expression de HuR est inversement corrélée à l'expression des microRNA miR-125a, miR-519, et miR-16. Des essais rapporteurs et des analyses par RT-qPCR montrent que HuR est la cible directe de ces microRNA, qui répriment son expression (Abdelmohsen, Srikantan et al. 2008; Guo, Wu et al. 2009; Xu, Zhang et al.). D'autres protéines de liaison aux ARNm sont régulées par des microRNA, telles que TTP ,qui est régulée par miR-29a, ou HuD, dont l'expression est réprimée par miR-375 (Gebeshuber, Zatloukal et al. 2009; Abdelmohsen, Hutchison et al.). De plus, les travaux de Eiring illustrent élégamment une boucle d'autorégulation entre une RNA-BP et un microRNA. Lorsque la différentiation des progéniteurs myéloïdes est inhibée, la protéine de liaison aux ARNm, hnRNPE2, inhibe la traduction de l'ARNm *C/EBPa*, qui code pour un facteur de transcription. Lors de la différenciation, hnRNP E2 est inhibée par miR-328, levant ainsi la répression de la traduction de l'ARNm *C/EBPa* est alors traduit et stimule la transcription de miR-328, créant ainsi une boucle d'autorégulation qui renforce la répression de hnRBP E2 et qui permet de réguler finement le processus de différenciation (Eiring, Harb et al. ; Beitzinger and Meister).

Enfin, les protéines de liaison aux ARNm régulent également la maturation des microRNA. Par exemple, hnRNPA1 peut se lier au niveau de la boucle terminale des pri-microRNA et induire un changement de conformation, qui facilite le clivage du pri-miR18a par le complexe Drosha /DGCR8 (Guil and Caceres 2007; Michlewski, Guil et al. 2008). Une autre étude récente montre que hnRNP A1 peut également inhiber la maturation par Drosha du pri-let-7a, en interférant avec la liaison de KSRP qui favorise la biogénèse de let-7 (Michlewski and Caceres). KSRP peut également favoriser la maturation cytoplasmique par Dicer de pré-microRNA tels que pré-miR-16, pré-miR-20, pré-miR-26b, pré-miR-106a et pré-miR-21 (Trabucchi, Briata et al. 2009). La protéine de liaison aux ARNm, Lin 28 inhibe la maturation exercée par Drosha et Dicer des microRNA let-7 et miR-125. Inversement, miR-125 et let-7 répriment l'expression de Lin 28 crééant ainsi une boucle d'autorégulation négative de l'expression de ces facteurs *trans* (Breving and Esquela-Kerscher).



**Figure 11: Régulation croisée de l'expression des facteurs** *trans.* (A) Il existe des boucles d'autorégulation de l'expression des RNA-BP entre–elles. (B) L'expression des RNA-BP peut être régulée par des microRNA. (C) Les RNA-BP peuvent modifier la maturation nucléaire et cytoplasmique des microRNA.

### *II.4.3.2. Effet coopératif ou compétitif entre les facteurs trans*

Les facteurs *trans* peuvent agir de manière synergique ou coopérer pour réguler l'expression spécifique de certains ARNm. Par exemple, dans des cellules de macrophages, TIA-1 et HuR agissent de manière synergique pour réprimer la traduction de plusieurs cytokines inflammatoires (Katsanou, Papadaki et al. 2005). De même, la liaison de AUF1 et de TIAR permet de réprimer de manière additive l'expression de *gadd45*, AUF1 en favorisant la dégradation de l'ARNm et TIAR en inhibant sa traduction (Lal, Abdelmohsen et al. 2006). Parfois la liaison d'une première protéine est nécessaire pour la liaison d'un autre facteur *trans*. Par exemple, la liaison de la RNA-BP, appelée Unr, au niveau de la structure IRES d'*Apaf1* ou celle de hnRNPE1 au niveau de l'IRES de *Bag-1*, permet l'ouverture de certaines boucles de la structure IRES autorisant ainsi la fixation de PTB, une autre protéine de liaison aux ARNm. PTB recrute alors les ribosomes pour favoriser la traduction de l'IRES de ces ARNm (Mitchell, Spriggs et al. 2003; Pickering, Mitchell et al. 2003). Les protéines de liaison aux ARNm peuvent également coopérer avec les microRNA pour réprimer l'expression spécifique de certains ARNm. Par exemple, la liaison de HuR sur l'ARNm de *c-myc* est nécessaire pour permettre la répression de l'expression de *c-myc* exercée par

let-7 (Kim, Kuwano et al. 2009). De même, le rôle de miR-16 dans la déstabilisation de l'ARNm de TNFα requiert TTP, qui interagit avec Ago2 au sein du complexe miRISC (Jing, Huang et al. 2005). L'importine 8 est également un composant essentiel du complexe miRNP et facilite le recrutement des protéines Argonautes sur les sites MRE présents dans les régions 3'UTR des ARNm cibles (Weinmann, Hock et al. 2009).

Dans d'autres cas, les facteurs *trans* peuvent entrer en compétition pour la liaison sur un site spécifique de l'ARNm. Par exemple, HuR et CUGBP2 entrent en compétition pour la liaison sur une séquence ARE située sur l'ARNm de *cox-2*. Des irradiations de cellules de carcinomes de colon engendrent un changement de liaison entre les deux RNA-BP. La liaison de CUGBP2, qui réprime la traduction de l'ARNm de *cox2*, empêche celle de HuR qui l'active, induisant ainsi une perte de l'expression de *cox-2* (Sureban, Murmu et al. 2007). Une RNA-BP peut aussi entrer en compétition avec un microRNA pour se fixer sur une séquence spécifique d'un ARNm. Par exemple, la protéine de liaison aux ARNm, Dnd1, en se fixant sur des séquences riches en uridine présentes au niveau des 3'UTR des ARNm de *LATS2* et de la *connexine 43*, bloque l'accessibilité des microRNA respectifs, miR-372 et miR1-206 sur leurs sites spécifiques d'interactions (Kedde, Strasser et al. 2007). De même, lors d'une stimulation inflammatoire par le ligand S100, hnRNPK est exportée hors du noyau. hnRNPK se lie alors à une séquence spécifique du 3'UTR de *cox-2* et empêche la fixation de miR-16 au niveau de cette séquence, levant ainsi l'inhibition de l'expression de *cox-2* exercée par mir-16 (Shanmugam, Reddy et al. 2008).

# II.4.3.3. Régulation de l'activité d'un microRNA ou de la localisation cellulaire de la miRNP par une RNA-BP

Les travaux de Bhattacharyya montrent que la liaison d'une RNA-BP sur un ARNm peut induire sa relocalisation cellulaire et influencer ainsi l'expression d'un ARNm. L'ARNm de *cat-1* est réprimé par miR-122 au niveau des P-Bodies. Lors d'une privation en sérum, la liaison de HuR à l'ARNm de *cat-1* induit un recrutement du complexe miRNP vers les polysomes et lève ainsi la répression de la traduction exercée par miR-122 (Bhattacharyya, Habermacher et al. 2006).

Dans certaines conditions, un microRNA est capable d'activer la traduction et cet effet est corrélé à la liaison d'une RNA-BP sur l'ARNm cible. En effet, les travaux de Vansudevan émettent l'hypothèse que, lors d'un arrêt du cycle cellulaire provoqué par une privation en sérum, miR-369-3 ne réprime pas l'expression de l'ARNm de  $TNF\alpha$ , mais active sa traduction. Cet effet est associé au recrutement de la protéine FXR1 au sein de la miRNP (Vasudevan and Steitz 2007).

#### III. Régulation de la traduction sous UV

L'inhibition de la traduction observée sous certaines conditions de stress, telles que les irradiations aux UV, permet de limiter la consommation d'énergie, estimée à plus de 50% de l'énergie de la cellule (Buttgereit and Brand 1995), pour le seul processus de la traduction et de rediriger les efforts vers la réparation des dommages ou la mise en place des mécanismes de survie. Pourtant une analyse à grande échelle réalisée à partir de fractionnements polysomiques dans des cellules exposées aux UV, révèle que certains ARNm résistent à l'inhibition générale de la traduction sous UV (Mazan-Mamczarz, Kawai et al. 2005; Powley, Kondrashov et al. 2009). Cependant les mécanismes par lesquels certains ARNm résistent à l'inhibition de la traduction ne sont pas encore clairement élucidés.

#### III.1. Inhibition de la traduction générale des ARNm sous UV

L'inhibition générale de la traduction observée sous différents stress, endommageant l'ADN ou induisant l'apoptose, peut être expliquée par différents mécanismes dont certains impliquent, par exemple, l'inhibition de la voie mTOR. Ces mécanismes sont décrits dans les revues suivantes (Sheikh and Fornace 1999; Clemens 2001; Gebauer and Hentze 2004; Holcik and Sonenberg 2005; Reiling and Sabatini 2006; Yamasaki and Anderson 2008). Nous n'exposerons pas dans ce paragraphe l'ensemble de ces mécanismes de manière exhaustive, mais nous nous focaliserons sur les mécanismes les plus décrits dans la littérature pour inhiber la traduction générale sous UV.

# III.1.1.Inhibition de l'expression de certains facteurs canoniques de la traduction sous UV par la protéine TIAR

Les travaux de Mazan-Mamczarz et al. ont mis en évidence que la protéine de liaison aux ARNm, TIAR participe à l'inhibition globale de la traduction sous UVC (Mazan-Mamczarz, Lal et al. 2006). En effet, cette étude montre que la sous-expression de cette protéine par des expériences d'interférence à l'ARN, empêche l'inhibition globale de la traduction induite par les UVC. TIAR réprime, sous UV, la traduction de certains facteurs canoniques de la traduction, tels que *eIF4A*, *eIF4E*, *eEF1B* (Annexe 2), ainsi que la traduction de *c-myc* qui contrôle lui–même la transcription de plusieurs facteurs canoniques de la traduction.

# III.1.2. Régulation de la formation du complexe ternaire eiF2-GTP-ANRt <sup>met</sup> par phosphorylation de eIF2 $\alpha$ sous UV

Lors de l'initiation de la traduction, la liaison de l'ARNtmet à la sous-unité ribosomique 40S nécessite un complexe ternaire, qui est constitué du facteur initiation eIF2, du GTP et du Met-ARNti met. La liaison du GTP à eIF2 est l'étape limitante de l'assemblement du complexe ternaire, et l'échange du GDP en GTP est catalysé par la GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) elF2B. En réponse à une irradiation sous UV, la sous-unité  $\alpha$  du facteur eIF2 est phosphorylée au niveau de la sérine 51 par les kinases GCN2 et PERK (Deng, Harding et al. 2002; Wu, Hu et al. 2002; Jiang and Wek 2005). La phosphorylation de eIF2 $\alpha$  induit une augmentation de son affinité pour eIF2B, qui est alors séquestré au sein du complexe inactif eIF2 $\alpha^{p}$ -eIF2B. Par conséquent, l'échange du GDP en GTP du complexe eIF2 est inhibé (Pavitt, Ramaiah et al. 1998; Sudhakar, Ramachandran et al. 2000). Le complexe ternaire de l'initiation ne peut plus se reformer, et la traduction globale de la plupart des ARNm est alors inhibée (Holcik and Sonenberg 2005) (Figure 12). Etant donné que eIF2B est présent en quantité limitante dans la cellule, même une faible augmentation de la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  aura des conséquences notables sur la formation du complexe ternaire et sur la traduction (Hershey 1991). La phosphorylation du facteur elF2 $\alpha$ , lors d'un stress, initie la formation de structures cytoplasmiques appelées stress granules. Les stress granules sont la conséquence de l'accumulation cytoplasmique des protéines de liaison aux ARNm, TIAR et TIA-1. En effet suite à une déplétion du complexe eiF2-GTP-tRNA<sup>met</sup> les protéines TIAR et TIA-1, localisées dans le cytoplasme, favorisent l'assemblement d'un complexe de préinitiation inactif, déficient en eIF2/eIF5 (Annexe 2), au niveau des ARNm dont la traduction est inhibée. Ces différents complexes s'agrègent alors pour former les stress granule (Kedersha, Gupta et al. 1999). Il existe un équilibre dynamique entre le pool d'ARNm présent dans les SG et celui présent dans les polysomes. Dès qu'un nouveau complexe ternaire contenant eIF5-eIF2 est reformé, il déplace la liaison de TIA-1 et le transcrit peut être de nouveau traduit (Anderson and Kedersha 2002).



**Figure 12 :** Régulation du complexe ternaire de l'initiation de la traduction par phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$ . Le complexe ternaire actif est composé du ARNt<sup>met</sup>, et du facteur eIF2 $\alpha$  lié au GTP. Lors de l'initiation de la traduction, la molécule de GTP est hydrolysée. L'échange du GDP en GTP au niveau du facteur eIF2 $\alpha$  est nécessaire pour former un nouveau complexe ternaire actif. Cet échange est catalysé par le facteur eIF2B. Sous UV, la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur eIF2 par les kinases PERK et GCN2, empêche sa dissociation avec le facteur eIF2B, et induit la séquestration d'un complexe eIF2-eIF2B – GDP inactif. L'échange du GDP en GTP est alors inhibé. Par conséquent, le complexe ternaire d'initiation de la traduction eIF2-GTP-Met-ARNti<sup>met</sup> ne peut pas se reformer et la traduction globale des ARNm est inhibée (d'après Holcik, 2005).

# III.1.3. Régulation de la formation du complexe d'initiation de la traduction eIF4F sous UV

L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe commence par la formation du complexe d'initiation 43S, qui est ensuite recruté au niveau de la coiffe des ARNm par son interaction avec le complexe eIF4F. eIF4F est composé de plusieurs protéines qui incluent :

(i) eIF4E qui se lie physiquement sur la coiffe des ARNm ;

(ii) eIF4A qui *via* son activité ARN-hélicase ATP-dépendante permet, de dérouler les structures secondaires ;

(iii) eIF4G qui peut être considéré comme un adaptateur moléculaire. Il relie en effet d'une part, eIF4E au complexe 43S et augmente l'affinité de ce dernier pour la coiffe des ARNm (Gross, Moerke et al. 2003) et d'autre part, la protéine PABP (Poly (A) Binding Protein), liée à la queue poly (A) de l'extrémité 3'UTR des ARNm, au complexe d'initiation de la traduction.

L'interaction eIF4E-eIF4G est régulée par des protéines appelées 4E-BP (4E-Binding Protein). Ces protéines entrent en compétition avec le facteur eIF4G pour se lier à eIF4E, empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F (Pause, Belsham et al. 1994) (Poulin, Gingras et al. 1998) (Marcotrigiano, Gingras et al. 1999). L'interaction entre les protéines 4E-BP et eIF4E va dépendre de l'état de phosphorylation des protéines 4E-BP (Karim, Hughes et al. 2001). L'affinité des protéines 4E-BP pour eIF4E est diminuée quand elles sont sous la forme hyperphosphorylée, et eIF4E est alors disponible pour se fixer sur eIF4G et initier la traduction (Figure 13). Sous certaines conditions de stress qui bloquent la prolifération cellulaire ou induisent l'apoptose, la phosphorylation des protéines 4E-BP est diminuée et la traduction est inhibée (Sheikh and Fornace 1999; Clemens 2001).



**Figure 13 : Liaison compétitive entre 4E-BP (sous sa forme hypophosphorylée) et elF4G pour le site d'interaction de elF4E.** Les protéines 4E-BP en se liant au facteur elF4E, empêchent l'interaction entre elF4E et elF4G et inhibent la traduction. Lorsque les protéines 4E-BP sont phosphorylées, elles ne peuvent plus se lier à elF4E. elF4E est alors disponible pour interagir avec elF4G et former le complexe elF4F nécessaire à la traduction dépendante de la coiffe (d'après Gebauer F ,2004).

Il a été également rapporté que le facteur eIF4G peut être phosphorylé par la protéine PAK2 (P21 Activated protein Kinase 2), qui est activée en réponse aux dommages à l'ADN, tels que les

radiations ionisantes, les UV et le cisplatine (Roig and Traugh 1999). La phosphorylation du facteur eIF4G limite sa liaison à eIF4E et inhibe la traduction (Ling, Morley et al. 2005). Enfin, on observe également un clivage des facteurs eIF4G, eIF2 $\alpha$ , eIF4B, eIF3 (Annexe 2) et des protéines 4E-BP au cours de l'apoptose induite par différents stress, qui renforce l'inhibition générale de la traduction observée sous stress (Marissen, Gradi et al. 2000) (Bushell, Poncet et al. 2000; Clemens, Bushell et al. 2000; Jeffrey, Bushell et al. 2002; Morley, Coldwell et al. 2005).

# III.2. Mécanismes cytoplasmiques post-transcriptionnels permettant à certains gènes de résister à l'inhibition générale de la traduction sous UV

## III.2.1.Rôle de séquences ou de structures spécifiques situées dans la région 5'UTR des ARNm dans la régulation de la traduction sélective des ARNm sous UV

## <u>Régulation de la traduction spécifique de certains ARNm sous UV par des petits cadres de</u> <u>lecture situés en amont du codon d'initiation</u>.

Les uORF (Upstream Open Reading Frame) sont de petits cadres de lecture situés dans la région 5'UTR, en amont du codon principal AUG. Après la reconnaissance et la traduction d'un uORF, le ribosome peut rester associé à l'ARNm et continuer le balayage de la région 5'UTR, pour réinitier la traduction au niveau d'un autre uORF ou au niveau de l'ORF principal du gène. Certaines séquences uORF sont riches en nucléotides AU et favorisent la poursuite du balayage de la région 5'UTR par le ribosome et donc la réinitiation du codon en aval. Alors que d'autres uORF peuvent être entourés de séquences souvent riches en GC qui favorisent le détachement des ribosomes (Dever 2002). Lorsque la quantité de complexes ternaires est suffisante, le ribosome peut traduire le premier uORF et réinitier la traduction des uORF suivants jusqu'à la rencontre d'un uORF inhibiteur, qui provoque la dissociation et le détachement des ribosomes. Lorsque la concentration en complexes ternaires est limitée, les ribosomes doivent balayer une plus longue distance au niveau de la région 5'UTR avant de se lier à de nouveaux complexes ternaires MettRNA<sub>i</sub> met. C'est pourquoi les ribosomes balayent la région 5'UTR sans traduire les uORF inhibiteurs et deviennent compétants pour réinitier la traduction seulement au niveau du codon d'initiation de l'ORF principal. La disponibilité du complexe ternaire est donc le facteur déterminant qui permet de contrôler les sites de réinitiation de la traduction de certains gènes et qui explique l'augmentation paradoxale de la traduction de certains ARNm, observée dans des conditions où la traduction est inhibée par phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  (Figure 14). Des travaux récents de l'équipe de Powley montrent que la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  suite à une exposition aux UV, induit une reprogrammation de la traduction de nombreux gènes impliqués

dans la réparation des dommages à l'ADN tels que *ERCC1, ERCC5, DDB1* par un mécanisme relié à la présence de petits uORF dans leur région 5'UTR (Powley, Kondrashov et al. 2009). L'augmentation de la traduction de ces ARNm sous UV est dépendante de l'activation de la voie DNA-PK.



**Figure 14 : Représentation schématique du rôle de petits uORF dans la traduction spécifique des ARNm sous stress.** Il existe des petits cadres de lecture qui permettent la réinitiation de la traduction (uORFa) et des petits cadres de lecture « inhibiteurs » qui favorisent la dissociation des ribosomes (uORFi). (A)Dans des conditions où la quantité de complexe ternaire est suffisante, le ribosome peut traduire le premier uORFa et réinitier la traduction des uORF suivants jusqu'à la rencontre d'uORF inhibiteur, qui provoque la dissociation et le détachement des ribosomes. (B) Lorsque la concentration de complexe ternaire est limitée, les ribosomes doivent balayer une plus longue distance au niveau de la région 5'UTR avant de se recharger en complexes ternaires Met-tRNA<sub>i</sub> <sup>met</sup>. C'est pourquoi les ribosomes balayent la région 5'UTR sans traduire les uORF inhibiteurs et deviennent compétants pour réinitier la traduction seulement au niveau du codon d'initiation de l'ORF principal (D'après Kondrashov, 2009).

## <u>Régulation de la traduction spécifique de certains gènes sous stress par recrutement des</u> <u>ribosomes au niveau de structures IRES</u>

Les IRES cellulaires facilitent, par leur structure secondaire, la liaison directe des ribosomes indépendamment de la formation du complexe eIF4F au niveau de la coiffe. Ils permettent donc la traduction sélective de messagers dans des conditions où la traduction dépendante de la coiffe est compromise par des stress physiologiques, qui induisent une déphosphorylation de 4E-BP et/ou un clivage protéolytique de eIF4G. Les gènes régulés par les structures IRES ont souvent un rôle

dans la prolifération, la croissance ou la mort cellulaire. Leur traduction sélective sous stress est donc un moyen pour les cellules de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales. Par exemple Apaf1, qui est un composant essentiel de la formation de l'apoptosome et de l'activation de la cascade de caspases, est traduit sélectivement sous UV par un mécanisme dépendant d'une séquence IRES. Sa traduction permet donc de contrôler la mort cellulaire sous UV (Ungureanu, Cloutier et al. 2006). La traduction de la sérine hydroxymethyl transférase 1 (SHMT1) est également régulée sous UV grâce à une séquence IRES présente dans sa région 5'UTR. SHMT1 permet de réguler la synthèse « *de novo* » des nucléotides de thymidine. Sa traduction spécifique sous UV lui confère donc un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN induits par les UV (Fox, Shin et al. 2009).

# III.2.2. Régulation des facteurs *trans s*ous UV et leur rôle dans la régulation de l'expression spécifique des gènes sous UV

#### Régulation de l'expression des microRNA sous UV

Une étude récente utilisant des puces à ADN observe, sur deux lignées cellulaires différentes (cellules Hela et fibroblastes primaires humains), une variation de l'expression des microRNA sous UV. Il est intéressant de noter que la variation de certains microRNA est spécifique de la lignée cellulaire. Par exemple l'expression de miR-26a diminue dans les fibroblastes primaires humains, alors que son expression est inchangée dans les cellules Hela. Cette étude montre également que la surexpression de miR-16 sous UV diminue l'expression de CDC25a, une cycline impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, et contribue ainsi au contrôle de la prolifération cellulaire sous UV (Pothof, Verkaik et al. 2009).

#### Régulation de l'expression des protéines de liaison aux ARNm sous UV

L'expression de certaines RNA-BP, telles hnRNPA 18 et hnRNPH 2, est augmentée sous UV (Yang and Carrier 2001; Fox, Shin et al. 2009). Comme hnRNPH 2 se lie à l'IRES de *SHMT1* et favorise sa traduction (Fox and Stover 2009), l'augmentation de l'expression de hnRNPH2 est associée à une augmentation de la traduction de *SHMT1* sous UV (Fox, Shin et al. 2009).

#### Régulation de la localisation cellulaire des protéines de liaison aux ARNm sous UV

Bien que la majorité des protéines de liaison à l'ARNm soit localisée au niveau nucléaire, sous certaines conditions de stress, telles que les irradiations aux UV, les protéines sont exportées vers le cytoplasme où elles peuvent alors contrôler la stabilité ou la traduction des ARNm. Par exemple, les protéines HnRNPA 1, HuR, CUGBP1, HnRNPA 18 et AUF1 sont délocalisées du noyau vers le

cytoplasme sous UV (Wang, Furneaux et al. 2000; Yang and Carrier 2001; Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004; Cammas, Pileur et al. 2007; Li, Si et al. 2008; Fox, Shin et al. 2009). Cette délocalisation est associée à l'activation de certaines voies de signalisation. Par exemple, la délocalisation de HuR et de HnRNPA 1 sous UV est dépendante de l'activation de la voie P38-MAPK (van der Houven van Oordt, Diaz-Meco et al. 2000; Li, Si et al. 2008). Ainsi, dans le cytoplasme certaines RNA-BP favorisent la stabilisation des ARNm. Par exemple, hnRPA 18 se fixe sur l'ARNm de *RPA2* et le stabilise (Yang and Carrier 2001). De même, la fixation de HuR sur les ARNm de *p21 et de CEBP* $\delta$  favorise leur stabilisation (Wang, Furneaux et al. 2000; Li, Si et al. 2008). Dans d'autres cas, la translocation cytoplasmique des protéines de liaison aux ARNm est associée à une augmentation sélective de la traduction des ARNm. Par exemple, HuR augmente la traduction sous UV de *p53* et de la *prothymosine*  $\alpha$  (Mazan-Mamczarz, Galban et al. 2003; Lal, Kawai et al. 2005) et CUGBP1 coopère avec hnRNPH pour favoriser la traduction IRES dépendante de *SHMT1* (Fox, Shin et al. 2009). Mais la translocation d'une protéine de liaison aux ARNm peut également réguler négativement la traduction d'un ARNm. Par exemple, sous UV, hnRPA 1 est relocalisée dans le cytoplasme et réprime la traduction d'Apaf1 (Cammas, Pileur et al. 2007).

#### Régulation de la liaison des RNA-BP sur leur ARNm cible sous UV

Les travaux menés par Yang montrent que la liaison de hnRNPA 18 à son ARNm cible est régulée sous UV. En effet, sous UV, la phosphorylation de hnRNPA 18 par la kinase GSK3 $\beta$  augmente l'interaction de hnRNPA 18 à la région 3'UTR de l'ARNm de la *thioredoxin* et augmente ainsi sa traduction (Yang, Weber et al. 2006).

Ainsi certaines régulations des facteurs *trans* sous UV, renforcent parfois l'inhibition de la traduction générale sous UV, en inhibant l'expression spécifique de certains gènes. Mais d'autres régulations de facteurs *trans* peuvent également intervenir dans différents mécanismes, qui permettent à certains gènes de résister à l'inhibition générale de la traduction induite par les UV.

### **Objectifs de l'étude**

Lors de différents stress génotoxiques ou oxydatifs, une reprogrammation rapide, spécifique et hautement contrôlée des gènes est nécessaire, pour permettre aux cellules de s'adapter rapidement et efficacement aux nouvelles conditions environnementales, en activant les mécanismes de défense cellulaire, qui favorisent la survie ou induisent l'apoptose. L'analyse de la distribution des ARNm dans les fractions polysomiques révèle que la traduction de la plupart des ARNm est inhibée sous différents stress. Pourtant, certains ARNm résistent à cette inhibition de la traduction, sans que les mécanismes ne soient totalement élucidés (Johannes, Carter et al. 1999; Blais, Filipenko et al. 2004; Mazan-Mamczarz, Kawai et al. 2005; Bushell, Stoneley et al. 2006) (Johannes and Sarnow 1998; Spriggs, Stoneley et al. 2008; Powley, Kondrashov et al. 2009).

Afin d'étendre la compréhension de ces mécanismes, nous nous sommes intéressés à la régulation du gène de réponse précoce rhoB, sous UV. RhoB joue un rôle essentiel dans la réponse des kératinocytes sous UV, en les protégeant de l'apoptose induite par les UV (Canguilhem, Pradines et al. 2005). Son rôle est donc important dans le maintient de l'intégrité de l'épiderme, pour que la peau puisse jouer son rôle de barrière vis-à-vis des agressions environnementales, telles que les irradiations aux UV. L'expression de RhoB est induite sous UV et résulte d'une augmentation de l'activité de son promoteur mais aussi d'une augmentation de la stabilité de son ARNm (Fritz and Kaina 1997; Fritz and Kaina 2001; Canguilhem, Pradines et al. 2005; Westmark, Bartleson et al. 2005). L'ARNm de rhoB présente plusieurs caractéristiques intéressantes, qui suggèrent qu'il pourrait être régulé au niveau traductionnel : il s'agit d'un gène sans intron, codant un ARNm avec une longue région 3'UTR de 1,4 kb, très conservée entre les différentes espèces(Westmark, Bartleson et al. 2005). Cette région est un élément de réponse aux facteurs de croissance et au cisplatine (Malcolm, Ettehadieh et al. 2003). La protéine de liaison aux ARNm, HuR est capable de se lier à la région 3'UTR de rhoB (Westmark, Bartleson et al. 2005). Des articles très récents mettent en évidence que l'ARNm de rhoB peut être régulé par des microRNA, qui interagissent avec des séquences présentes dans sa région 3'UTR (Connolly, Van Doorslaer et al. ; Sun, Li et al.).

De plus, comme nous l'avons décrit précédemment dans l'introduction (*§1.3 et §1.4.3*) *rhoB* présente certaines caractéristiques de gène suppresseur de tumeur et son expression est diminuée dans un certain nombre de tumeurs sans que les mécanismes ne soient totalement établis (Mazieres, Antonia et al. 2004) (Adnane, Muro-Cacho et al. 2002) (Forget, Desrosiers et al. 2002) (Zhou, Zhu et al.).

#### <u>Cette étude présente donc un double intérêt :</u>

- Elle contribue à comprendre comment des gènes sont sélectivement traduits sous un stress, tel que les UV, pour participer à la réponse cellulaire vis-à-vis des dommages à l'ADN.
- Elle permet d'etudier un nouveau niveau de régulation de l'expression de *rhoB*, dans la perspective de trouver une explication possible à la dérégulation de l'expression de RhoB observée dans plusieurs types de cancers.

#### Les objectifs de cette étude ont été les suivants :

(i) Déterminer l'efficacité de traduction de l'ARNm de *rhoB* sous UV, dans des conditions où la traduction générale des ARNm est inhibée.

(ii) Etudier l'implication de la région 3'UTR de *rhoB* dans la régulation traductionnelle de *rhoB* sous UV.

(iii) Identifier la séquence *cis*-régulatrice intervenant dans la régulation traductionnelle de *rhoB* sous UV.

(iv) Identifier les facteurs *trans* qui participent à la régulation traductionnelle de *rhoB* sous UV.

(v) Etudier la conséquence fonctionnelle sur l'apoptose de la régulation de la traduction de *rhoB* sous UV par les facteurs *trans* identifiés.

## Résultats

### I. rhoB résiste à l'inhibition générale de la traduction sous UV





**Figure 15 : Régulation traductionnelle de** *rhoB* **sous UV.** (A) Les cellules HaCat sont exposées à des doses croissantes d'UV (J/m<sup>2</sup>). 8h après, les protéines sont extraites et leurs expressions sont analysées par Western Blot avec les anticorps dirigés contre RhoB ; eIF2 $\alpha$ -P ; eIF2 $\alpha$  et l'actine (B) (i)Représentation du profil de la distribution des polysomes obtenu après centrifugation des lysats cellulaires sur gradient de densité de sucrose. OD : Densité optique ; RNP complexe RiboNucleoProtéique (ii) Les lysats sont préparés à partir de cellules irradiées ou non aux UV (8h ; 60J/m<sup>2</sup>). Le rapport de la distribution des ARNm (P/NP) des fractions polysomiques (P) sur les fractions non polysomiques (NP) des cellules exposées aux UV comparé à celui des cellules non exposées est mesuré par RT-qPCR.

Le modèle cellulaire choisi pour cette étude est celui des kératinocytes humains immortalisés HaCat, puisqu'il s'agit d'un modèle de référence, déjà utilisé pour étudier l'effet de RhoB sur l'apoptose induite par les UV (Canguilhem, Pradines et al. 2005). Sous UV, le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  est phosphorylé par les kinases GNC2 et PERK (Wu, Hu et al. 2002) (Deng, Harding et al. 2002), ce qui provoque une inhibition globale de la traduction en réduisant la formation de nouveaux complexes ternaires de l'initiation de la traduction. Pour vérifier que dans nos conditions expérimentales, les UV induisent une inhibition générale de la traduction, nous avons donc étudié la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 $\alpha$ . Pour cela, nous avons exposé les cellules HaCat à des doses croissantes d'UVC et récupéré les extraits cellulaires 8 h après l'exposition aux UV. A ce temps, d'après les résultats obtenus par Bruno Canguilhem, l'expression de RhoB sous UV atteint un plateau (Canguilhem, Pradines et al. 2005). Nous observons sur le Western blot (Figure 15A), une augmentation de la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  dès la dose de 20 J/m2, ce qui confirme que la traduction globale des ARNm dans notre modèle est inhibée sous UV. Dans ces conditions, on observe une augmentation de la protéine RhoB qui est maximale à la dose de 60 j/m<sup>2</sup>. C'est donc cette dose qui est utilisée pour la suite des expériences.

Pour déterminer si la traduction de *rhoB* est maintenue dans des conditions où la traduction générale est compromise, nous avons examiné l'association de l'ARNm rhoB aux polysomes. Pour cela, nous avons réalisé un fractionnement des polysomes à partir d'extraits cytoplasmiques exposés ou non aux UV (Annexe 4). Le principe de ce fractionnement est expliqué dans le document complémentaire (Annexe 3). Les fractions appelées polysomiques (P), de 7 à 16, contenant les ARNm associés aux polysomes et donc engagés dans la traduction ont été regroupées et sont comparées aux fractions non polysomiques (NP) de 1 à 6, contenant les ARNm liés à un seul ribosome ou aux complexes ribonucléoprotéiques, donc non traduits. Les ARNm de chacun des deux groupes sont extraits et la quantité des ARNm est quantifiée par RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Les résultats obtenus, présentés sur le graphique (Figure 15B (ii)) montrent une diminution du rapport (P/NP) pour les ARNm de l'actine ou de gapdh dans les cellules exposées aux UV par rapport aux cellules non exposées, ce qui est cohérent avec l'inhibition générale de la traduction sous UV. En revanche, la distribution polysomique des ARNm de rhoB ou de p53 est inchangée sous UV, ce qui montre que ces ARNm résistent à l'inhibition générale de la traduction sous UV. Dans cette expérience p53, est utilisé comme contrôle positif, puisque les travaux de Mazan-Mamczarz montrent que sa traduction n'est pas inhibée sous UV (Mazan-Mamczarz, Galban et al. 2003).

# II. La région 3'UTR de rhoB est impliquée dans la régulation traductionnelle de rhoB sous UV



**Figure 16** : **Implication de la région 3'UTR de** *rhoB* **dans sa régulation sous UV.** Les cellules HaCat sont transfectées avec les constructions RLuc ou RLuc-3'UTR *rhoB* et exposées aux UV, 16h après les transfections. (A) 8h après, l'expression relative de la luciférase *renilla* par rapport à la luciférase *firefly* est mesurée (B) L'efficacité de traduction est évaluée en normalisant l'activité luciférase à la quantité d'ARNm (C) Le rapport de la distribution polysomique (P/NP) des fractions polysomiques (P) par rapport aux fractions non polysomiques (NP) des cellules exposées aux UV comparées aux cellules non exposées est mesuré par RT-qPCR pour chaque construction transfectée.

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la traduction de *rhoB*, nous nous sommes intéressés à la région 3'UTR de *rhoB* pour plusieurs raisons (Annexe 5) :

(i) Cette région contient plusieurs séquences ARE (AU-rich élément) très conservées entre les espèces. Or il est connu que des facteurs *trans* peuvent venir se lier au niveau de séquences ARE pour réguler la traduction (Barreau, Paillard et al. 2005).

(ii) Des études antérieures ont montré que HuR, une protéine de liaison aux ARNm, est capable de se fixer sur une séquence ARE canonique située dans la région 3'UTR de l'ARNm de *rhoB* (Westmark, Bartleson et al. 2005).

(iii) La région 3'UTR de *rhoB* est connue pour être un élément de réponse au cisplatine ou aux facteurs de croissance (Malcolm, Ettehadieh et al. 2003)

(iV) En utilisant le logiciel Target Scan (<u>www.targetscan.org</u>), nous avons observé que la région 3'UTR de *rhoB* contient plusieurs sites putatifs de fixation de microRNA. Or une étude récente montre que les microRNA peuvent réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN sous UV (Pothof, Verkaik et al. 2009).

Afin d'étudier l'implication de la région 3'UTR de *rhoB* dans la régulation de son expression, nous avons cloné la région 3'UTR de *rhoB*, d'une longueur de 1381 nucléotides, en aval du gène luciférase *renilla*, à partir d'un plasmide commercial pRL-CMV sans intron (Promega). Ce modèle permet de s'affranchir de la régulation transcriptionnelle, puisque le gène rapporteur codant la luciférase *renilla* est sous le contrôle du promoteur CMV constitutif. Les variations des activités luciférases sont ainsi la conséquence de mécanismes mettant en jeu les séquences ajoutées en 3' du gène rapporteur. De la même manière, nous avons réalisé le clonage du plasmide contrôle 3'UTR *p53* lucR. Ces différentes constructions sont transfectées dans les cellules HaCat, 16h avant de les exposer aux UV. Un plasmide contrôle contenant la luciférase *firefly* est également co-transfecté comme témoin interne, afin de normaliser l'éfficacité de la transfection.

La comparaison des activités luciférases obtenues après la transfection du plasmide 3'UTR *rhoB* Rluc par rapport au plasmide contrôle Rluc, montre que l'ajout de la région 3'UTR de *rhoB* réprime l'expression du gène rapporteur dans des cellules non exposées aux UV (Annexe 6), ce qui est cohérent puisque la région 3'UTR de *rhoB* contient des éléments *cis*-régulateurs déstabilisants de type ARE (Westmark, Bartleson et al. 2005). En représentant l'effet du traitement aux UV sous forme d'induction par rapport aux cellules non exposées, nous trouvons que, sous UV, la région 3'UTR de *rhoB* confère une augmentation de l'expression luciférase de 2 fois par rapport à celle obtenue dans des cellules transfectées par le vecteur lucR contrôle. Cette induction est comparable à celle induite par la région 3'UTR *p53* (Figure 16A). Ces effets sont également retrouvés dans des kératinocytes primaires humains exposées aux UVB, ce qui permet de supposer l'importance physiologique de cette régulation (Annexe 7).

Etant donné que l'ARNm de *rhoB* est également stabilisé sous UV, pour distinguer si l'effet obtenu en mesurant l'activité luciférase est la conséquence d'une régulation de la traduction ou de la stabilité du messager, nous avons mesuré l'efficacité de la traduction, en normalisant l'activité luciférase par la quantité d'ARNm (Vasudevan, Tong et al. 2007). Nous observons, sous UV, une augmentation de l'efficacité de la traduction, dans les cellules transfectées avec les constructions contenant la région 3'UTR de *rhoB* ou la région *3'UTR de p53*, qui est respectivement 2 ou 1,6 fois plus importante par rapport à l'efficacité de traduction obtenue dans les cellules transfectées avec la construction contrôle lucR (Figure 16 B). L'analyse de la distribution des ARNm rapporteurs dans les polysomes révèle que l'ajout des régions 3'UTR de *rhoB* ou de *p53*, permet un recrutement plus efficace des ARNm rapporteurs sous UV, dans les fractions traduites des polysomes (Figure 16 C). En conclusion, les régions 3'UTR de *rhoB* et de *p53* contiennent des éléments qui leur permettent de résister à l'inhibition générale de la traduction sous UV.

## III. Une région contenant à la fois le site de fixation de HuR et le site putatif de fixation de miR-19 est requise pour la régulation de l'expression de rhoB sous UV

Pour déterminer les éléments cis-régulateurs impliqués dans la régulation traductionnelle de rhoB sous UV, nous avons réalisé différentes délétions de la région 3'UTR de rhoB. Chaque construction est transfectée dans les cellules HaCat exposées ou non aux UV et l'activité luciférase est mesurée. Les résultats montrent qu'une séquence de 98 pb, localisée entre les nucléotides 779 et 877 de la région 3'UTR de rhoB, est requise pour induire l'expression de rhoB sous UV. En effet, l'expression du rapporteur luciférase n'est pas augmentée lorsque les cellules sont transfectées avec les constructions ( $\Delta 34$  -878) ( $\Delta 34$  - 1088) et ( $\Delta 34$  -1088), qui ne contiennent pas cet élément de séquence (Figure 17A). De manière intéressante, cette région contient une séquence canonique conservée ARE, sur laquelle une interaction avec la protéine HuR dans des cellules de rat a été démontrée (Westmark, Bartleson et al. 2005). En utilisant le logiciel Target Scan pour rechercher des sites potentiels de fixation de microRNA sur cette région, nous avons identifié le site putatif de fixation de miR-19 (Figure 17B). Ce site possède une séquence de 8 bases UUUGCACA, qui peut potentiellement jouer le rôle d'ancrage du microRNA miR-19 au niveau de son extrémité 5' (base 2 à 9). Cette séquence est parfaitement conservée entre 15 ou 16 organismes, comme en témoigne l'alignement de séquences, obtenu par Target Scan. Il a été montré que ces deux critères sont essentiels pour prédire la fixation spécifique d'un microRNA sur son ARNm cible (Lewis, Shih et al. 2003) (Grimson, Farh et al. 2007) (Brennecke, Stark et al. 2005). Aussi miR-19a et/ou miR-19b, qui diffèrent d'un seul nucléotide en position 11, pourraient être impliqués dans le contrôle de la traduction de *rhoB* sous UV.



**Figure 17 : Implication d'une séquence de 98 nucléotides de longueur (de 779 à 877 nt) située au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm de** *rhoB* **dans la régulation de son expression sous UV**. (A) Les cellules HaCat sont transfectées par différentes constructions contenant une délétion de la région 3'UTR de *rhoB*. Le rapport de l'activité luciférase relative des cellules exposées aux UV par rapport aux cellules non exposées est reporté sur le graphique de droite (B) Les séquences comprises entre les nucléotides 818 et 870 contiennent un site de liaison pour la protéine de liaison aux ARNm, HuR, et un site putatif de liaison de miR-19 identifié par le logiciel TargetScan.

#### IV. HuR et miR-19 régulent négativement l'expression de rhoB

Pour étudier l'effet de miR-19 sur l'expression endogène de RhoB, nous avons transfecté un « antimiR » contre miR-19, qui bloque la fonction du microRNA. Nous observons, par la technique de Western Blot, une augmentation de l'expression de RhoB d'environ trois fois, lorsque les cellules HaCat, non exposées aux UV, sont transfectées avec l'anti-miR-19, par rapport aux cellules non transfectées ou transfectées avec un anti-miR contrôle (Figure 18A (i)). Cet effet est accompagné d'une petite augmentation de l'ARNm de *rhoB* comme le montrent les résultats obtenus par RTqPCR (Figure 18A (ii)). Cet effet est moins important que l'induction de la protéine RhoB et est caractéristique de la régulation par un microRNA. miR-19 régule donc négativement la traduction de *rhoB*. D'une manière similaire, nous avons induit une inhibition de l'expression de HuR en transfectant les cellules par un siRNA ou un mélange de siRNA spécifiques de la séquence de HuR. Cette inhibition induit une augmentation (x3) de l'expression de la protéine RhoB comme l'indique le Western Blot (Figure 18B(i)), alors qu'aucune variation de la quantité d'ARNm *rhoB*, analysée par RT-qPCR, n'est observée (Figure 18B(ii)). Cela montre que HuR réprime la traduction de l'ARNm de *rhoB*.



**Figure 18 : HuR et miR-19 régulent négativement l'expression de RhoB. (A) (B)** Les cellules HaCat sont transfectées avec un anti-miR-19 (A) ou avec un siRNA dirigé contre HuR (B). L'expression de la protéine RhoB est analysée en Western blot (i) et la quantité relative d'ARNm de *rhoB*, normalisée par celle de *GAPDH* est quantifiée par RT-qPCR(ii) (C) Les cellules HaCat sont transfectées avec les différentes constructions mutées pour le site de fixation de HuR et/ou de miR-19. Les activités luciférases *renilla*, normalisée par les activités luciférases *firefly*, sont indiquées sur le graphique.

Afin de déterminer si la régulation de la traduction de *rhoB* est dépendante de la liaison directe de HuR et de miR-19 sur l'ARNm de *rhoB*, nous avons muté la construction plasmidique Rluc *rhoB* 3'UTR au niveau des sites respectifs de fixation de ces deux facteurs. Les mutations des sites de fixation de HuR et de miR-19 lèvent la répression de l'expression du rapporteur luciférase, exercée par la région 3'UTR de *rhoB*. Ce qui confirme que HuR et miR-19 régulent négativement l'expression de *rhoB*. De manière intéressante, l'induction de l'expression luciférase n'est pas plus importante lorsque les deux sites de fixation de HuR et de miR-19 sont mutés sur une même construction. Cela suggère que les effets de HuR et de miR-19 sur la traduction de *rhoB* ne sont pas additifs, mais que ces deux facteurs coopèrent pour réprimer la traduction de *rhoB* (Figure 18C).



#### V. HuR et miR-19 sont impliqués dans la régulation de rhoB sous UV

**Figure 19 : Régulation de l'expression de RhoB sous UV par HuR et miR-19**. Les cellules HaCat sont transfectées avec un précurseur de miR-19 (mimic-19) (A) ou avec un siRNA dirigé contre HuR (B). 48h après les cellules sont exposées aux UV (60J/m<sup>2</sup>; 8h) et les extraits cellulaires sont analysés par Western blot avec les anticorps anti-RhoB, anti-HuR et anti-actine.

Pour étudier l'effet de miR-19 sur la régulation de *rhoB* sous UV, nous avons transfecté un précurseur synthétisé chimiquement de miR-19 (mimic-19) dans les cellules HaCat, exposées ou non aux UV, et analysé l'expression de RhoB par Western blot. L'augmentation de l'expression de RhoB observée sous UV est diminuée quand miR-19 est surexprimé, ce qui montre que miR-19 joue un rôle dans cette régulation (Figure 19A). Par ailleurs, la sous-expression de HuR induite par un siRNA diminue l'induction de RhoB sous UV de 3 fois (Figure 19B). En conclusion, nous avons idéntifié deux facteurs *trans* HuR et miR-19 impliqués dans la régulation de l'expression de RhoB sous UV.

# VI. Mir-19, en régulant l'expression de rhoB, participe à la réponse aux dommages à l'ADN sous UV, en régulant l'apoptose

Des travaux antérieurs, réalisés au laboratoire, ont montré que RhoB protège les HaCat de l'apoptose induite par les UV (Canguilhem, Pradines et al. 2005). Pour analyser les conséquences fonctionnelles de la régulation de *rhoB* par miR-19 sous UV, nous avons transfecté les cellules HaCat avec un oligonucléotide précurseur de miR-19b et observé le clivage de la protéine PARP (poly (ADP-ribosose) polymérase), un substrat de la caspase 3, clivé lors de l'apoptose. Nous observons que le clivage de PARP est plus important sous UV dans les cellules transfectées avec le précurseur de miR-19, dans des conditions où on observe une diminution de l'expression de RhoB. Cet effet est spécifique de miR-19 puisqu'il n'est pas retrouvé dans les cellules transfectées avec l'oligonucléotide contrôle précurseur de miR-24 (Figure 20A). L'effet de miR-19 sur l'apoptose est observée par la fluorescence verte des cellules. En utilisant cette méthode, on observe également une augmentation de l'apoptose sous UV lorsque les cellules sont transfectées avec le précurseur de miR-19. Cet effet est comparable à celui retrouvé quand l'expression de *rhoB* est inhibée par un siRNA et il est spécifique de miR-19 puisqu'il n'est pas observé dans les cellules transfectées avec le précurseur de miR-19. Cet effet est comparable à celui retrouvé quand l'expression de *rhoB* est inhibée par un siRNA et il est spécifique de miR-19 puisqu'il n'est pas observé dans les cellules transfectées avec le précurseur de miR-24 (Figure 20B).

En conclusion, miR-19, en régulant l'expression de RhoB sous UV, participe à la réponse aux dommages à l'ADN, en régulant l'apoptose induite par les UV.



**Figure 20 : miR-19, en régulant l'expression de RhoB, participe la réponse apoptotique induite par les UV. (A)** Les cellules HaCat sont transfectées avec un oligonucléotide synthétique miR-19 ou miR-24. 48h après, les cellules sont exposées aux UV (60J/m<sup>2</sup>; 8h) et les extraits cellulaires sont analysés par Western blot avec les anticorps anti-RhoB, anti-PARP et anti-actine. **(B)** Les cellules HaCat sont transfectées avec un oligonucléotide synthétique miR-19 ou un oligonucléotide synthétique miR-24 ou un siRNA dirigé contre RhoB. 8h après l'exposition aux UV, les cellules apoptotiques sont détectées par la méthode Tunel « ApopTag® Fluorescein direct in situ apoptosis détection kit » (Millipore) selon les recommandations du fournisseur. 600 cellules sont comptées pour chaque expérience. **(C)** La quantification des cellules apoptotiques, positives avec la méthode Tunel est représentée sur le graphique.

## Matériel et Méthode

#### I. Culture cellulaire et irradiation aux UV

Les cellules de kératinocytes humains immortalisées (HaCat) sont cultivées dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's contenant 4,5 g de glucose et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, invitrogen) dans une atmosphère avec 5% de CO2 et 95 % d'humidité. Les primocultures de kératinocytes humains sont réalisées à partir d'explants cutanés correspondants aux déchets opératoires de diminutions mammaires (BOH2-Hôpital Rangueil-Toulouse). L'épiderme est prélevé puis incubé dans une solution de PBS-trypsine 0,25% pendant une nuit. Les cellules sont ensuite dissociées mécaniquement et mises en culture dans du milieu KSFM (invitrogen) supplémenté avec de l'extrait pituitaire bovin (25µg/ml) et de EGF recombinant (1,5ng /ml).

#### Irradiation aux UV

Les cellules sont privées en sérum, 24h avant l'exposition aux UV. Pour l'irradiation, le milieu est remplacé par du tampon phosphate (PBS), les cellules sont exposées soit aux UVC (60 J/m<sup>2</sup>) soit aux UVB (400J/m<sup>2</sup>) en utilisant respectivement les systèmes de lampes UV stratalinker (254 nm ; stratagene) et UVB RMX3W (312 nm ; Biosun). Après l'irradiation, le PBS est remplacé par le milieu DMEM-10% de SVF initial et les cellules sont incubées à 37°C pendant 8h.

#### **II.** Constructions plasmidiques

Les vecteurs plasmidiques Rluc-*P53* 3'UTR et Rluc-*rhoB* 3'UTR ont été construits en insérant la région 3'UTR de *P53* ou la région 3'UTR de *rhoB*, dans le plasmide commercial sans Intron pRL-CMV (Promega) au niveau des sites de restriction de Xbal et BamHI. Les délétions de la région 3'UTR de *rhoB* sont obtenues par PCR, en utilisant des amorces contenant le site de restriction de XhoI. Les amorces utilisées pour les PCR sont décrites dans le tableau 2 cidessous. Les mutations des sites de fixations de HuR et de miR-19 sont introduites en utilisant le kit de mutagénèse dirigée QuickChange site-directed mutagenesis kit II (Stratagene), selon les recommandations du fournisseur et ont été vérifiées par séquençage.

	Forward	Reverse
3'UTR rhoB	5'GCTCTAGAAAGGTGCTATGAGG GCCG 3'	5'CGGGATCCCGGAGTTGGCAAGAAAG GATCT 3'
3'UTR <i>P5</i> 3	5'CAGACTAGTTGACTCAGACTGA CATTCT 3'	5'GCTAGATCTTGGCAGCAAAGTTTTA TTGTA 3'
3'UTR <i>rhoB</i> mut miR-19	5'TTTGTTTTTTTTTTTCTTT <mark>CGAG</mark> AATTGTTTCATTGTTTGACACTT 3'	5'ΑΑGTGTCAAACAATGAAACAATTCT CGAAAGAATAAAAAAACAAA 3'
3'UTR <i>rhoB</i> mut- HuR	5'CTGATGTTATTT <u>GATTTAAGAA</u> <u>AAGG</u> CTAAAATTTG 3'	5'CAAATTTTAGCCTTT <mark>TCT</mark> TAAATCA AATAACATCAG 3'
3'UTR $rhoB \Delta$ 34-418	5'GCTCTCGAGTCTGAAGAGCCGG GCCT 3'	5'GGACTCGAGTGCCGGCAGGGGCAGG 3'
3'UTR $rhoB \Delta$ 34-878	5'TGCTCTCGAGTTGACACTTAAT GCACTCGT 3'	5'GGACTCGAGTGCCGGCAGGGGCAGG 3'
3'UTR rhoB $\Delta$ 34-1088	5'GCTCTCGAGTAAAGGGCAGTAA CAAGTATTG 3'	5'GGACTCGAGTGCCGGCAGGGGCAGG 3'
3'UTR rhoB Δ 1109-1285	5'GCTCTCGAGTGACAAAATGGTG AGCTTATG 3'	5'GCTCTCGAGTGACAAAATGGTGAGC TTATG 3'
3'UTR rhoB Δ 778-1285	5'GCTCTCGAGTGACAAAATGGTG AGCTTATG 3'	5'GCTCTCGAGCAGGCACAAAGTTCGC TTAT 3'

Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés pour les clonages et les constructions mutées

### III. Transfection d'oligonucléotides

Une réverse transfection en utilisant l'agent transfectant Lipofectamine <sup>TM</sup> RNAimax (Invitrogen) permet d'introduire les siRNA, contrôle ou dirigé contre la séquence de HuR (synthétisés par Eurogentec; séquences décrites dans le tableau 3 ci-dessous) à la concentration de 20nM, ainsi que les oligonucléotides précurseurs des microRNA miR-19b, miR 24, et oligonucléotide control (allstars negative control siRNA) (Qiagen) à la concentration de 2nM et l'anti-miR-19b ou l'anti-miR control (miScript inhibitor negative control) à la concentration de 50nM.

siHuR	5'-AAGAGGCAATTACCAGTTTCA-3'	(Kawai et al., 2006)
siHuR'	Pool of 5 ' – AATCTTAAGTTTCGTAAGTTA–3 ' 5 ' – TTCGTAAGTTATTTCCTTTAA–3 ' 5 ' – TTCCTTTAAGATATATATTAA–3 '	(Gorospe et al., 2008)
siCtrl	5′-ACUCUAUCUGCACGCUGACUU-3′	

Kawai et al., Mol Cell Biol. (2006) 26(8) : 3295-307 Galban et al., Mol Cell Biol. (2008) 28(1) : 93-107

Tableau 3 : Séquences de siRNA utilisés pour cette étude

### IV. Transfection de plasmides et essai de rapporteur de gène luciférase

Les constructions plasmidiques (1,5µg) sont transfectées transitoirement dans des boîtes de 12 puits, ensemencées la veille à la densité de 70 000 cellules par puits, en utilisant comme agent transfectant le jetPeI (Polyplus-transfection). Les cellules sont arrêtées 24h après la transfection, lavées avec du PBS, et lysées avec 200 µl par puits de Passive Lysis Buffer 1X (Promega) pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Les activités luciférases *renilla* et *firefly* de 30 µl de chaque lysat sont mesurées simultanément avec un luminomètre (MicroLumat Plus LB 96V, Berthold), à l'aide du kit Dual Luciferase Assay (Promega).

### V. Western Blot

Les cellules sont lavées avec du PBS et lysées, pendant 30 min à 4°C, dans du tampon RIPA (Tris 50 mM pH 7,5; NaCl 150 nM; EDTA 5 mM; Triton 1%; NaF 50 mM; deoxycholate de sodium 0,5%; SDS 0,1%), auquel on ajoute de l'orthovanadate de sodium (2 mM), du paranitrophényphosphate (6,4 mg/ml) et des inhibiteurs de protéases 1% (Sigma). Après 10 minutes de centrifugation à 10000g, les protéines contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode « Bicinchoninic Acid Protein » (BCA; sigma), puis dénaturées pendant 20 min à température ambiante dans du bleu de dépôt (Tris 60 nM pH 6,8; SDS 2%; glycerol 8%; bleu de bromophénol 0,001%) additionné de DiThioThreitol (DTT, 20 mM). 50 µg de protéines sont séparées par SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide, puis éléctro-transférées sur membrane de Poly-Vinyle Diène-Fluoride (PVDF) (Hybond-P, Amersham Biosciences) pendant 1h30. La membrane est ensuite saturée pendant 30 min à température ambiante dans du tampon Tris Buffer Saline

Tween (TBST) (Tris 25 mM pH 8; Nacl 140 mM; Tween20 0,1%) supplémenté avec 5% de lait, puis incubée dans du TBST-1% lait avec l'anticorps primaire d'intérêt pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, après plusieurs lavages dans du TBST (3x10 min), la membrane est incubée dans du TBST-1% lait avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante. Après plusieurs lavages dans du TBST (3x10min), la révélation est effectuée par chimioluminescence (ECL, Pierce) sur films autoradiographiques. Les signaux obtenus sur l'autoradiographie sont quantifiés avec le logiciel Image J. Les anticorps utilisés pour cette étude sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Anticorps	Туре	Laboratoire	Dilution
RhoB (clone 119)	Polyclonal lapin	Santacruz Biotechnology	1/5000
HuR (clone 3A2)	Monoclonal souris	ABCAM	1/1000
eIF2α	Polyclonal lapin	Cell signaling	1/1000
PeIF2a	Polyclonal lapin	Cell signaling	1/1000
Actine	Monoclonal souris	Chemicon	1/10000
Souris	Polyclonal chèvre	Biorad	1/50000
Lapin	Polyclonal chèvre	Biorad	1/50000

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les Western blot

#### VI. Extraction ARN et RT-qPCR

Les ARN totaux des cellules ou les ARN des fractions polysomiques ont été isolés en utilisant respectivement du TRIZOL ou du TRIZOL LS Reagent®. Le détail des protocoles figure en annexe 9). La qualité des ARN est visualisée sur gel d'agarose et la quantité est déterminée par un spectrophotomètre. Pour chaque condition, 1 µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits dans un volume final de 20 µl à l'aide du kit iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit (Biorad), selon les recommandations du fournisseur. Le mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 min pour la dénaturation, puis la rétro-transcription se fait à 42°C pendant 30 min, puis une incubation de 5 min à 85°C permet d'inactiver l'enzyme. Les ADNc obtenus sont dilués au 1/10ème, puis analysés par PCR en temps réel en utilisant les amorces spécifiques des différents gènes d'interêts (Tableau 5 ; ci-dessous) avec le système de détection iCycler iQreal-time PCR et le kit iQ<sup>™</sup> SYBR Green Supermix (Bio-rad) selon les recommandations du fournisseur.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les q-PCR

RhoB Forward	5'-GTGCCTGCTGATCGTGTTC-3'
RhoB Reverse	5'-GCGGTCGTAGTCCTCCTG-3'
Beta-actin Forward	5 ′ -CCTCGCCTTTGCCGATCCG-3 ′
Beta-actin Reverse	5 ′ -ATGCCGGAGCCGTTGTCG-3 ′
p53 Forward	5 ' -GTGGTGGTGCCCTATGAG-3 '
p53 Forward	5 ' -GAGTCTTCCAGTGTGATGATG-3 '
GAPDH Forward	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
GAPDH Reverse	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
RLuc Forward	5'-TGGTAACGCGGCCTCTTC-3'
RLuc Reverse	5'-ATTTGCCTGATTTGCCCATAC-3'
FLuc Forward	5'-GGATGGAACCGCTGGAGAG-3'
Fluc Reverse	5'-GCTTCTGCCAACCGAACG-3'

### VII. Analyse du fractionnement des polysomes

30 millions de HaCat par condition sont utilisées pour cette expérience. Les cellules sont traitées avec 0,1 mg/ml de cycloheximide (CHX) pendant 15 min à 37°C, lavées deux fois avec du PBS/CHX froid et grattées dans du PBS/CHX froid. Après centrifugation pendant 5 min à 3000 rpm, les culots cellulaires sont resuspendus dans 400µl de tampon LSB (20 mM tris ; ph 7,5 ; 100mM de NaCl ; 3mM MgCl<sub>2</sub> et 100U/ml Rnasine). Après homogénéisation avec 12 coups de Dounce, 400 µl de LSB contenant 0,2% de triton X100 et 0,25 M de sucrose sont ajoutés. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Le lysat est déposé sur 11,3 ml d'un gradient continu de sucrose (15%-50% de sucrose dans du tampon LSB). Une ultracentrifugation à 38000 rpm dans un rotor SW41-Ti à 4°C est réalisée et les fractions sont collectées avec un fractionnateur ISCO (Lincoln, NE ; Foxy Jr fraction collector coupled to UA-6 UV detector). L'absorbance à 254 nm est mesurée de manière continue et 17 fractions de 0,9 ml sont collectées.

### VIII. Analyse de l'apoptose par la méthode de TUNEL

La fragmentation de l'ADN, induite par l'apoptose, est détectée par fluorescence en utilisant la méthode TUNEL avec le kit « ApopTag® Fluorescein direct in situ apoptosis détection kit » (Millipore) en suivant les recommandations du fournisseur.

### Discussion

Sous UV, la traduction de la plupart des ARNm, tels que l'actine ou GAPDH, est inhibée en partie par un mécanisme impliquant la phosphorylation du facteur d'initiation elF2 $\alpha$ . En analysant la répartition de l'ARNm de rhoB dans des fractions polysomiques de cellules HaCat, nous avons démontré que la traduction de l'ARNm de rhoB résiste à l'inhibition générale de la traduction sous UV (Figure 15). Les mécanismes régulant la traduction spécifique des gènes impliquent les régions non traduites des ARNm, sur lesquelles des facteurs trans peuvent se fixer (Keene and Tenenbaum 2002; Barreau, Paillard et al. 2005; Chatterjee and Pal 2009; Fabian, Sonenberg et al.). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la région 3'UTR de *rhoB*, qui est une longue région de plus de 1300 pb, très conservée entre les espèces, sur laquelle HuR et plusieurs microRNA peuvent interagir (Westmark, Bartleson et al. 2005; Connolly, Van Doorslaer et al. ; Sun, Li et al.). Des expériences de rapporteurs luciférases ont permis de mettre en évidence l'implication de la région 3'UTR de rhoB dans sa régulation sous UV. Cela est confirmé également par des analyses de fractionnements des polysomes qui montrent que la région 3'UTR de rhoB sous UV confère un recrutement plus efficace des ARNm rapporteurs codant la luciférase renilla, dans les fractions lourdes, donc les mieux traduites, des polysomes (Figure 16). Afin d'identifier plus précisément les éléments en *cis* présents dans la région 3'UTR de *rhoB*, qui participent à la régulation de l'expression de rhoB sous UV, nous avons réalisé différentes délétions de sa région 3'UTR. La comparaison des activités luciférases obtenues dans les cellules HaCat transfectées par les différentes constructions a permis de mettre en évidence le rôle d'une région de 98 pb comprenant le site de fixation de HuR identifié par Westmark (Westmark, Bartleson et al. 2005), ainsi que le site putatif de fixation de miR-19 (Figure 17). Dans des cellules non exposées aux UV, la sous-expression de miR-19 ou de HuR, par stratégie siRNA, est accompagnée d'une augmentation de l'expression de RhoB. De même, l'activité luciférase, mesurée dans les HaCat, transfectées avec les plasmides mutés au niveau du site de fixation de HuR ou de miR-19, est plus élevée par rapport à celle obtenue dans les cellules transfectées avec la construction contenant la région 3'UTR rhoB sauvage. Cela montre que HuR et miR-19 régulent directement et négativement l'expression de RhoB, en se fixant au niveau de sa région 3'UTR (Figure 18 (A et B)). Ce résultat est en contradiction avec les travaux de Westmark, qui suggèrent une interaction stabilisatrice entre HuR et certaines séquences de la région 3'UTR de rhoB. Cependant, cette hypothèse est fondée uniquement sur une corrélation entre les deux observations suivantes :

- HuR est capable de se lier sur une séquence de la région 3'UTR de *rhoB*
- L'ARNm de *rhoB* est stabilisé sous UV

Mais aucun lien fonctionnel n'avait été établi (Westmark, Bartleson et al. 2005). De plus, nous observons que l'activité luciférase des cellules transfectées par un plasmide présentant les deux mutations pour le site de fixation de HuR et celui de miR-19 n'est pas plus élevée que celle obtenue dans les cellules transfectées par les constructions contenant l'une ou l'autre des mutations (Figure 18 (C)). Ce résultat suggère que miR-19 et HuR agissent de manière concertée pour réprimer l'expression de RhoB. Cela est cohérent avec des travaux récents qui montrent que la protéine de liaison HuR peut réguler négativement l'expression de *c-myc* et de *p16* en recrutant le complexe miRISC au niveau de leur région 3'UTR (Kim, Kuwano et al. 2009; Chang, Yi et al.). Il serait donc intéressant d'approfondir le mécanisme par lequel HuR et miR-19 régulent négativement l'expression de RhoB. Pour cela, nous envisageons d'étudier l'effet de la sous-expression de HuR sur l'association de l'ARNm de *rhoB* à la protéine Argonaute 2 (Ago2), un des composants clé du complexe miRISC, par des expériences d'immunoprécipitation d'ARN (RIP).

Nos résultats montrent également que HuR et miR-19 sont impliqués dans la régulation de l'expression de RhoB sous UV (Figure 19). Des résultats antérieurs, réalisés au sein de l'équipe, ont mis en évidence que RhoB protège les cellules HaCat de l'apoptose induite par les UV. Nous montrons également que miR-19, en régulant l'expression de RhoB, participe à la réponse aux dommages à l'ADN, en régulant l'apoptose sous UV (Figure 20).

Il faudrait à présent déterminer plus précisément le mécanisme par lequel HuR et miR-19 régulent l'expression de RhoB sous UV. Deux hypothèses sont envisageables :

(i) soit l'expression de miR-19 et/ou HuR pourrait être diminuée sous UV. En effet, une étude menée par Pothof montre que l'expression des microRNA varie sous UV (Pothof, Verkaik et al. 2009). Pour tester cette première hypothèse, il faudrait donc examiner l'expression de miR-19 dans des cellules HaCat exposées ou non aux UV par RT-qPCR. Quant à la protéine HuR, les résultats du Western blot (Figure 19) montrent que son expression est inchangée sous UV.

(ii) soit la liaison de miR-19 et/ou HuR à l'ARNm de RhoB pourrait être altérée sous UV. En effet, deux études montrent que les microRNA peuvent jouer un rôle dans certains processus physiologiques, sans qu'aucune modification de leur expression ne soit observée (Bhattacharyya, Habermacher et al. 2006; van Rooij, Sutherland et al. 2007), suggérant que d'autres mécanismes comme par exemple, la modification de la liaison d'un microRNA sur son ARNm cible, pourraient intervenir. Concernant HuR, plusieurs sites de phosphorylations altérant son affinité pour les ARNm ont été identifiés (Introduction § II.4.1.3). Par exemple, sa phosphorylation sur la serine 100 par Chk2, une kinase activée en réponse aux dommages à l'ADN, induits par les radiations ionisantes ou par les UV (Matsuoka, Rotman et al. 2000), diminue la liaison de HuR sur l'ARNm de *sirt1* (Abdelmohsen, Pullmann et al. 2007). Nous envisageons donc de tester, par des expériences de RIP, si l'association du complexe miRISC ou de HuR à l'ARNm de *rhoB* est diminuée sous UV, et d'explorer d'eventuelles modifications post-traductionnelles de HuR sous UV.
Enfin, pour comprendre comment l'ARNm de *rhoB* est régulé sous UV, nous avons étudié dans un premier temps le rôle de sa région 3'UTR, mais des séquences situées dans sa région codante ou dans sa région 5'UTR pourraient également intervenir dans sa régulation post-transcriptionnelle. Il serait donc intéressant d'étendre ces premières données à l'étude de l'ARNm entier de *rhoB*, pour examiner, par exemple, si la traduction de l'ARNm de *rhoB* ne pourrait pas aussi être régulée par d'autres mécanismes mettant en jeu, par exemple, des petits cadres de lecture ou des séquences IRES dans sa région 5'UTR.

Par ailleurs, plusieurs études montrent que l'expression de RhoB est diminuée dans un certain nombre de cancers, notamment dans les cancers pulmonaires, où cette perte d'expression est proportionnelle au stade d'avancement de la maladie (Mazieres, Antonia et al. 2004), mais aussi dans les cancers de la sphère ORL (Adnane, Muro-Cacho et al. 2002) et dans les glioblastomes (Forget, Desrosiers et al. 2002). Des études concernant la régulation transcriptionnelle de *rhoB* (Tovar, Faye et al. 2003; Mazieres, Tovar et al. 2007) ont été réalisées au sein de l'équipe, mais aucune altération de cette régulation ne semble pouvoir expliquer de manière exhaustive les variations d'expression de RhoB observées dans les tissus tumoraux. En utilisant le modèle de la régulation traductionnelle de rhoB sous UV, cela nous a permis d'identifier deux nouveaux facteurs, HuR et miR-19, régulant négativement l'expression de RhoB. L'effet de HuR sur l'expression de RhoB a également été confirmé sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses (Annexe 8). Nous émettons donc l'hypothèse que la surexpression de ces facteurs posttranscriptionnels pourrait être responsable de la diminution de l'expression de RhoB observée dans certaines tumeurs. Cette idée est soutenue par plusieurs données de la littérature. Tout d'abord, il existe une forte corrélation entre l'expression de HuR et les cancers. Le gène humain de HuR est localisé sur le chromosome 19p13.2, un locus associé à de nombreuses translocations oncogéniques dans les tumeurs humaines (Ma and Furneaux 1997). Des analyses de « tissue array » mettent en évidence une surexpression de HuR dans la majorité des tissus cancéreux examinés par rapport aux tissus sains (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003). Plusieurs études reportent plus précisément un lien entre la surexpression de HuR, associée dans certains cas à sa délocalisation cytoplasmique, et le stade d'avancement de la malignité dans les cancers du sein, du colon, du poumon et de l'ovaire (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003; Heinonen, Bono et al. 2005; Heinonen, Fagerholm et al. 2007; Brosens, Keller et al. 2008; Lim, Lee et al. 2009; Wang, Zhao et al. 2009; Yoo, Sullivan et al. 2009; Raspaglio, De Maria et al.). La surexpression de HuR augmente la croissance des cellules cancéreuses de colon dans un modèle de xénogreffe de souris nude (Lopez de Silanes, Fan et al. 2003). Et, inversement, l'inhibition de HuR in vivo ou in vitro diminue la croissance cellulaire des cellules tumorales, inhibe leur prolifération et induit leur apoptose (Danilin, Sourbier et al.). HuR régule de nombreux ARNm codant des protéines impliquées dans

l'augmentation de la division cellulaire, dans la résistance à l'apoptose, dans la maintenance de l'angiogénèse, dans l'invasion et la formation de métastases, ainsi que dans l'échappement des cellules à la réponse immune antitumorale (Lopez de Silanes, Lal et al. 2005) (Figure 21). En régulant de manière coordonnée ces différents transcrits, HuR pourrait jouer un rôle considérable sur l'acquisition du phénotype cancéreux des cellules.



**Figure 21 : Implication de HuR dans la cangérogénèse.** HuR, en s'associant et en régulant l'expression de différents ARNm impliqués dans les processus de prolifération, d'invasion et de métastases, d'angiogénèse, de survie et d'échappement de la réponse immunitaire antitumorale, joue un rôle central dans l'oncogénèse. \* HuR diminue la traduction de ces transcrits (c-myc et p27) ou l'association de HuR pour TSP1 est diminuée dans les cancers (d'après Abdelmohsen, 2010).

Quant au microRNA miR-19, il est situé sur le locus miR-17-92 qui code pour six microRNA (miR-17-5 ; miR-18a ; miR-19a ; miR-20a, miR-19b et miR-92), exprimés à partir d'un même transcrit primaire. Les microRNA du polycistron miR-17-92 ont été identifiés comme étant potentiellement oncogéniques (He, Thomson et al. 2005). Le locus miR-17-92 est en effet localisé dans la région 13q31-32 fréquemment amplifiée dans plusieurs types de lymphomes et de tumeurs solides (poumon, colon, gliomes) où, par conséquent, on observe une surexpression de ces microRNA (Ota, Tagawa et al. 2004; Hayashita, Osada et al. 2005; Rinaldi, Poretti et al. 2007; Diosdado, van de Wiel et al. 2009; Ernst, Campos et al.). Plusieurs études montrent que miR-19 est essentiel pour l'activité oncogénique du cluster 17-92 (Olive, Bennett et al. 2009; Mavrakis, Wolfe et al.). miR-19 est également retrouvé dans une signature de microRNA caractéristique des stades angiogéniques des cancers (Olson, Lu et al. 2009). Or, les études du laboratoire suggèrent que la perte d'expression de RhoB dans les tumeurs modifie les propriétés invasives et angiogéniques des cellules tumorales (Bousquet, Mazieres et al. 2009).

Ainsi nos résultats, associés à ces données bibliographiques, nous permettent de penser que la diminution de l'expression de RhoB dans les cancers pourrait être une conséquence de la surexpression de miR-19 et de HuR. Nous envisageons donc d'analyser l'expression de HuR en immunohistochimie et celle de miR-19 par RT-qPCR sur une cohorte de patients atteints de cancers pulmonaires, où une diminution de l'expression de RhoB a été observée (Mazieres, Antonia et al. 2004).

# **ANNEXE 1 : BIBLIOGRAPHIE DU TABLEAU 1**

- Kuwano, Y., H.H. Kim, K. Abdelmohsen, et al., *MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90.* Mol Cell Biol, 2008.
   28(14): p. 4562-75. PMID: 18490444.
- Song, I.S., S. Tatebe, W. Dai, et al., Delayed mechanism for induction of gammaglutamylcysteine synthetase heavy subunit mRNA stability by oxidative stress involving p38 mitogen-activated protein kinase signaling. J Biol Chem, 2005.
   280(31): p. 28230-40. PMID: 15946948.
- 3. Abdelmohsen, K., R. Pullmann, Jr., A. Lal, et al., *Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression.* Mol Cell, 2007. **25**(4): p. 543-57. PMID: 17317627.
- 4. Li, B., J. Si, and J.W. DeWille, *Ultraviolet radiation (UVR) activates p38 MAP kinase and induces post-transcriptional stabilization of the C/EBPdelta mRNA in G0 growth arrested mammary epithelial cells.* J Cell Biochem, 2008. **103**(5): p. 1657-69. PMID: 17902160.
- 5. Wang, W., H. Furneaux, H. Cheng, et al., *HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 760-9. PMID: 10629032.
- 6. Doller, A., A. Huwiler, R. Muller, et al., *Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(6): p. 2137-48. PMID: 17392515.
- Doller, A., S. Akool el, A. Huwiler, et al., *Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA.* Mol Cell Biol, 2008.
   28(8): p. 2608-25. PMID: 18285462.
- 8. Doller, A., K. Schlepckow, H. Schwalbe, et al., *Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR.* Mol Cell Biol. **30**(6): p. 1397-410. PMID: 20086103.

- van der Giessen, K. and I.E. Gallouzi, *Involvement of transportin 2-mediated HuR import in muscle cell differentiation.* Mol Biol Cell, 2007. 18(7): p. 2619-29. PMID: 17475777.
- Mazan-Mamczarz, K., S. Galban, I. Lopez de Silanes, et al., *RNA-binding protein HuR* enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8354-9. PMID: 12821781.
- Lal, A., T. Kawai, X. Yang, et al., Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. EMBO J, 2005. 24(10): p. 1852-62. PMID: 15861128.
- Kawai, T., A. Lal, X. Yang, et al., *Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR.* Mol Cell Biol, 2006. 26(8): p. 3295-307. PMID: 16581801.
- Liu, L., J.N. Rao, T. Zou, et al., Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2dependent HuR phosphorylation. Mol Biol Cell, 2009. 20(23): p. 4885-98. PMID: 19812253.
- Galban, S., Y. Kuwano, R. Pullmann, Jr., et al., *RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha.* Mol Cell Biol, 2008.
  28(1): p. 93-107. PMID: 17967866.
- Kullmann, M., U. Gopfert, B. Siewe, et al., *ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR.* Genes Dev, 2002. 16(23): p. 3087-99. PMID: 12464637.
- Meng, Z., P.H. King, L.B. Nabors, et al., *The ELAV RNA-stability factor HuR binds the* 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. Nucleic Acids Res, 2005. 33(9): p. 2962-79. PMID: 15914670.
- 17. Kim, H.H., Y. Kuwano, S. Srikantan, et al., *HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression.* Genes Dev, 2009. **23**(15): p. 1743-8. PMID: 19574298.

- 18. Brewer, G., *An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(5): p. 2460-6. PMID: 1901943.
- Loflin, P., C.Y. Chen, and A.B. Shyu, Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. Genes Dev, 1999.
   13(14): p. 1884-97. PMID: 10421639.
- 20. Sarkar, B., Q. Xi, C. He, et al., *Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6685-93. PMID: 12944492.
- Lal, A., K. Mazan-Mamczarz, T. Kawai, et al., *Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs.* EMBO J, 2004. 23(15): p. 3092-102.
  PMID: 15257295.
- Raineri, I., D. Wegmueller, B. Gross, et al., *Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference.* Nucleic Acids Res, 2004. 32(4): p. 1279-88. PMID: 14976220.
- Lal, A., K. Abdelmohsen, R. Pullmann, et al., *Posttranscriptional derepression of GADD45alpha by genotoxic stress.* Mol Cell, 2006. **22**(1): p. 117-28. PMID: 16600875.
- 24. Sela-Brown, A., J. Silver, G. Brewer, et al., *Identification of AUF1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability.* J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7424-9. PMID: 10702317.
- Xu, N., C.Y. Chen, and A.B. Shyu, Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. Mol Cell Biol, 2001. 21(20): p. 6960-71. PMID: 11564879.
- 26. Horner, T.J., W.S. Lai, D.J. Stumpo, et al., *Stimulation of polo-like kinase 3 mRNA decay by tristetraprolin.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(8): p. 1999-2010. PMID: 19188452.
- 27. Lai, W.S. and P.J. Blackshear, Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in

*the absence of a poly(A) tail.* J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 23144-54. PMID: 11279239.

- Ogilvie, R.L., J.R. Sternjohn, B. Rattenbacher, et al., *Tristetraprolin mediates interferon-gamma mRNA decay.* J Biol Chem, 2009. 284(17): p. 11216-23. PMID: 19258311.
- 29. Lai, W.S., J.S. Parker, S.F. Grissom, et al., Novel mRNA targets for tristetraprolin (*TTP*) identified by global analysis of stabilized transcripts in *TTP-deficient* fibroblasts. Mol Cell Biol, 2006. **26**(24): p. 9196-208. PMID: 17030620.
- 30. Stoecklin, G., S.A. Tenenbaum, T. Mayo, et al., *Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin.* J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11689-99. PMID: 18256032.
- 31. Taylor, G.A., E. Carballo, D.M. Lee, et al., *A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency.* Immunity, 1996. **4**(5): p. 445-54. PMID: 8630730.
- Stoecklin, G., M. Colombi, I. Raineri, et al., *Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover.* EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4709-18. PMID: 12198173.
- 33. Lai, W.S., E. Carballo, J.M. Thorn, et al., *Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA.* J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17827-37. PMID: 10751406.
- 34. Chen, C.Y., R. Gherzi, S.E. Ong, et al., *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs.* Cell, 2001. **107**(4): p. 451-64. PMID: 11719186.
- 35. Gherzi, R., K.Y. Lee, P. Briata, et al., *A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery.* Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 571-83. PMID: 15175153.

- Linker, K., A. Pautz, M. Fechir, et al., *Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR.* Nucleic Acids Res, 2005. 33(15): p. 4813-27. PMID: 16126846.
- 37. Nechama, M., Y. Peng, O. Bell, et al., *KSRP-PMR1-exosome association determines parathyroid hormone mRNA levels and stability in transfected cells.* BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 70. PMID: 19775426.
- 38. Li, H., W. Chen, Y. Zhou, et al., *Identification of mRNA binding proteins that regulate the stability of LDL receptor mRNA through AU-rich elements.* J Lipid Res, 2009.
  50(5): p. 820-31. PMID: 19141871.
- Xu, M., J.R. McCarrey, and N.B. Hecht, A cytoplasmic variant of the KH-type splicing regulatory protein serves as a decay-promoting factor for phosphoglycerate kinase 2 mRNA in murine male germ cells. Nucleic Acids Res, 2008. 36(22): p. 7157-67. PMID: 19015122.
- 40. Tadesse, H., J. Deschenes-Furry, S. Boisvenue, et al., *KH-type splicing regulatory protein interacts with survival motor neuron protein and is misregulated in spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(4): p. 506-24. PMID: 17998247.
- 41. Sureban, S.M., N. Murmu, P. Rodriguez, et al., *Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation.*Gastroenterology, 2007. 132(3): p. 1055-65. PMID: 17383427.
- 42. Hagele, S., U. Kuhn, M. Boning, et al., *Cytoplasmic polyadenylation-element-binding* protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1alpha mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1alpha protein expression. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 235-46. PMID: 18752464.
- 43. Mukhopadhyay, D., C.W. Houchen, S. Kennedy, et al., *Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein*, *CUGBP2.* Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 113-26. PMID: 12535526.
- 44. Subramaniam, D., G. Natarajan, S. Ramalingam, et al., *Translation inhibition during* cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein

*CUGBP2.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(4): p. G1025-32. PMID: 18292181.

- 45. Xu, K., C.M. Kitchen, H.K. Shu, et al., *Platelet-derived growth factor-induced stabilization of cyclooxygenase 2 mRNA in rat smooth muscle cells requires the c-Src family of protein-tyrosine kinases.* J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32699-709. PMID: 17855367.
- 46. Paillard, L., V. Legagneux, D. Maniey, et al., *c-Jun ARE targets mRNA deadenylation by an EDEN-BP (embryo deadenylation element-binding protein)-dependent pathway.* J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3232-5. PMID: 11707455.
- 47. Zhang, L., J.E. Lee, J. Wilusz, et al., *The RNA-binding protein CUGBP1 regulates* stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22457-63. PMID: 18559347.
- 48. Lee, J.E., J.Y. Lee, J. Wilusz, et al., Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. PLoS One. 5(6): p. e11201. PMID: 20574513.
- 49. Iakova, P., G.L. Wang, L. Timchenko, et al., *Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate.* EMBO J, 2004. 23(2): p. 406-17. PMID: 14726956.
- 50. Timchenko, N.A., P. Iakova, Z.J. Cai, et al., *Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy.* Mol Cell Biol, 2001. 21(20): p. 6927-38.
   PMID: 11564876.
- 51. Timchenko, N.A., A.L. Welm, X. Lu, et al., *CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4517-25. PMID: 10536163.
- 52. Horb, L.D. and M.E. Horb, *BrunoL1 regulates endoderm proliferation through translational enhancement of cyclin A2 mRNA.* Dev Biol. **345**(2): p. 156-69. PMID: 20633547.

- 53. Fox, J.T. and P.J. Stover, *Mechanism of the internal ribosome entry site-mediated translation of serine hydroxymethyltransferase 1.* J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 31085-96. PMID: 19734143.
- 54. Mazan-Mamczarz, K., A. Lal, J.L. Martindale, et al., *Translational repression by RNAbinding protein TIAR.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2716-27. PMID: 16537914.
- 55. Tong, X., R.T. Van Dross, A. Abu-Yousif, et al., *Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(1): p. 283-96. PMID: 17074806.
- Otake, Y., S. Soundararajan, T.K. Sengupta, et al., Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. Blood, 2007. 109(7): p. 3069-75. PMID: 17179226.
- 57. Ishimaru, D., L. Zuraw, S. Ramalingam, et al., *Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1).* J Biol Chem. 285(35): p. 27182-91. PMID: 20571027.
- 58. Zheng, X., Y. Zhang, Y.Q. Chen, et al., *Inhibition of NF-kappaB stabilizes gadd45alpha mRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(1): p. 95-9. PMID: 15721278.
- 59. Singh, K., J. Laughlin, P.A. Kosinski, et al., *Nucleolin is a second component of the CD154 mRNA stability complex that regulates mRNA turnover in activated T cells.* J Immunol, 2004. **173**(2): p. 976-85. PMID: 15240685.
- 60. Miniard, A.C., L.M. Middleton, M.E. Budiman, et al., *Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression*. Nucleic Acids Res. 38(14): p. 4807-20. PMID: 20385601.
- 61. Fahling, M., A. Steege, A. Perlewitz, et al., *Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1731**(1): p. 32-40. PMID: 16153722.

62. Takagi, M., M.J. Absalon, K.G. McLure, et al., *Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin.* Cell, 2005.
123(1): p. 49-63. PMID: 16213212.

# **ANNEXE 2 : FACTEURS DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION**

La traduction chez les eucaryotes s'effectue en trois étapes : initiation, élongation et terminaison. Chaque étape requiert des facteurs de traduction (facteurs d'initiation eIF, facteurs d'élongation eEF, facteurs de terminaison eRF) qui sont associés de manière transitoire aux ribosomes. Les facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction sont décrits dans le tableau ci-dessous. L'initiation de la traduction commençe par la formation du complexe de pré initiation 425, qui est

L'initiation de la traduction commence par la formation du complexe de pré-initiation 43S, qui est recruté, le plus souvent, au niveau de la coiffe de l'ARNm, puis balaye la région 5'UTR jusqu'à la reconnaissance du codon d'initiation. Après la reconnaissance du codon initiateur, la sous unité ribosomiques 60S est recrutée pour former le complexe ribosomique 80S (Figure ci- dessous).



#### Figure Annexe 2: Initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes

(1) Dissociation du complexe de post-terminaison.(2) Formation du complexe ternaire comprenant eIF2-GTP-Met-tRNA <sup>met</sup> i. (3) Formation du complexe de pré-initiation 43S comprenant la sous-unité 40S, eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF2-GTP-Met-tRNA <sup>met</sup> i (4) Le complexe eIF4F, composé de eIF4E, eIF4A, et eIF4G, s'associe avec la coiffe de l'ARNm et à PABP, entraînant une circularisation de l'ARNm. (5) Recrutement du complexe 43S au niveau de l'ARNm par interaction avec le complexe eIF4F. (6) Le complexe 43S balaye alors la région 5'UTR jusqu'à la reconnaissance du codon d'initiation. (7) Reconnaissance du codon AUG, et formation du complexe 48S, suivi de l'hydrolyse du GTP lié à eIF2-GTP. (8) Liaison de la sous-unité 60 S au complexe 48S et dissociation des facteurs eIF1, eIF3, eIF4B, eiF4F et eiF5, médiée par eiF5B. (9) L'hydrolyse du GTP de eIF5B et la dissociation des facteurs e1F1A et eIF5B-GDP permet la formation du ribosome 80S capable d'initier l'étape d'élongation de la synthèse protéique (D'après Jackson R J 2010).

#### Tableau Annexe 2 : Facteurs d'initiation de la traduction.

Nom du facteur de	Nombre de sous	Fonction
l'Initiation	unités et masse	
	moléculaire (kDa)	
Facteurs canoniques		
eIF2	3 (36,1 ; 38,4 et 51,1)	Forme le complexe ternaire eIF2-GTP-Met tRNA <sub>i</sub> , qui se lie à la sous-unité ribosomique 40S
eIF3	13 (800 au total)	Se lie à la sous-unité 40S, et aux facteurs eIF1, eIF4G, eIF5 ; favorise l'attachement du complexe 43S à l'ARNm et assiste le processus de balayage des ribosomes ; favorise la dissociation des ribosomes et empêche la jonction des sous-unités 40S et 60S
eIF1	1 (12,7)	Assure la fidélité de la sélection du codon d'initiation ; favorise le processus de balayage ; stimule la liaison de eIF2-GTP-Met- tRNA <sub>i</sub> à la sous-unité 40S ; empêche l'hydrolyse du GTP lié au facteur eIF2, induit par eIF5
eIF1A	1 (16,5)	Stimule la liaison de eIF2-GTP-Met tRNA <sub>i</sub> à la sous- unité 40S et coopére avec eIF1 pour faciliter le balayage des ribosomes et la sélection du codon d'initiation.
eIF4E	1 (24,5)	Se lie à la coiffe des ARNm
eIF4A*	1 (46,1)	ATPase DEAD-box et RNA helicase ATP-dependante : favorise le déroulement des structures secondaires de l'ARNm
eIF4G**	1 (175,5)	Se lie à eIF4E, eIF4A, eIF3 et augmente l'activité hélicase de eIF4A
eIF4F	3 (246,1 au total)	Complexe de liaison à la coiffe des ARNm, comprenant les facteurs eIF4E, eIF4A et eIF4G; permet le déroulement de la région proximale 5'UTR des ARNm; favorise la liaison du complexe 43S au niveau de la coiffe et assiste les ribosomes dans le processus de balayage de la région 5'UTR des ARNm
eIF4B	1 (69,3)	Protéine de liaison aux ARNm qui augmente l'activité hélicase de eIF4A
eIF4H	1 (27,4)	Protéine de liaison aux ARNm qui augmente l'activité hélicase de eIF4A et qui est un homologue du fragment de eIF4B
eIF5	1 (49,2)	Protéine qui possède une activité GTPasique, spécifique pour le facteur eIF2 lié au GTP ; induit l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 lors de la reconnaissance du codon d'initiation
eIF5B	1 (138,9)	Une GTPase dépendante des ribosomes, qui favorise l'association des sous-unités ribosomiques
eIF2B	5 (33,7 ; 39 ; 50,2 ; 59,7 et 80,3)	Une GEF (guanosine nucleotide exchange factor) qui favorise l'echange de GTP en GDP du facteur eIF2
Facteurs auxiliaires		
elF6	1 (26,6)	Facteur qui se lie sur la sous-unité ribosomique 60S, et qui empêche sa liaison à la sous-unité 40S
PABP	1 (70,7)	Se lie à la queue poly (A) des ARNm, à eIF4G et eRF3 ; augmente la liaison de eIF4F à la coiffe des ARNm ; facilite le recrutement des sous-unité 40S, après l'étape de terminaison, au niveau de l'extrémité 5'UTR des ARNm

eiF, eukaryotic initiation factor; PABP, Poly(A)-binding protein;\* deux paralogues (eIF4AI et eIF4AII) qui sont codés à partir de différents gènes mais qui présentent des fonctions similaires;\*\* deux paralogues (eIF4GI et eIF4GII) qui sont codés à partir de différents gènes, qui présentent des fonctions similaires mais une affinité différente en fonction de l'ARNm. eIF4GI est généralement le plus abondant dans les cellules (D'après Jackson R J 2010).

### **ANNEXE 3 : PRINCIPE DU FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS POLYSOMIQUES**

De haut en bas les complexes sédimentent en fonction de leur gradients de densité (haut : faible densité ; bas : densité élevée). Ainsi on retrouve les complexes ribonucléoprotéiques (RNP), les sous unités 40S, les sous unités 60S, les ribosomes 80 S en haut du gradient dans les fractions les plus légères, puis plus le nombre de polysomes associés à l'ARNm est important, plus les ARNm seront retrouvés dans les fractions lourdes des polysomes.





**Figure Annexe 4 : La traduction de** *rhoB* **est régulée sous UV**. (A)Les lysats cytoplasmiques de cellules HaCat exposées ou non aux UV (UVC 60 J/m<sup>2</sup>; 8h) sont fractionnés au moyen d'un gradient de sucrose. Les ARNm de chaque fraction sont déposés sur gel d'agarose afin de vérifier que le fractionnement et l'extraction d'ARN ont été correctement réalisés (B) Les distributions relatives (%) de l'ARNm *rhoB* (graphique du bas) et de l'ARNm de l'*actine* (graphique du haut) sont analysées par rt-qPCR pour chacune des 17 fractions polysomiques.

# ANNEXE 5 :



**Figure Annexe 5 A : Représentation schématique de la structure du gène RhoB.** *rhoB* est un gène sans intron qui contient une longue région 3'UTR de plus de 1300pb. HuR est une protéine capable d'interagir avec la région 3'UTR de l'ARNm de *rhoB* (Westmark, 2005). Les sites putatifs de fixation de microRNA identifiés avec le logiciel Targetscan sont indiqués.

tgagggeege gecegtegeg cetgeecetg eeggeaegge 1021 teccectect ggaccagtee eeeggagee eggagaaggg gagaceegtg teccacaagg 1081 accocacegg cctgcctggc atctgtctgc tgacgcctct ggcttgegcc aggacttggc 1141 gtgggcaccg ggcgccccca teccagtgte tgtgtgcgte cagetgtgtt gcacaggeet 1201 gggeteecea etgagtgeea agggteeeet gageatgett ttetgaagag eegggeetea 1261 gagtgtgtgg etgtgtgtet gttegaetee eetegeeeea tttteaeeee acceegeet 1321 ctgatecceg ggggegagat tggegeggga gtgtggeege geeceateag atgttetece 1381 ttcaccageg ggagettgat atceettgte tgtaacatag acceegggta etgegggagg 1441 ggagggctgc tggggggggtgt tatataaata tagatataat tttattttcg 1501 gagetaagat ggtgtt<mark>attt a</mark>agggtggtg atgggtgage getetggeee aggetgggee 1561 agactecege ecaagcatga acaggaettg accatettte caaceeetgg ggaagacatt 1621 tgcaactgac ttggggagga cacagettea geacageete teetgeggge cageeegetg 1681 cgaaccetee accagetace ggagggagga gggaggatge getgtggggt tgtttttgee 1741 ataagegaac tttgtgeetg teetagaagt gaaaattgtt cagteeaaga aactgatgtt 1901 atttg<mark>attta tttaaa</mark>gget aaaatttgtt ttttt</mark>attet ttgeacaatt gttteattgt 1861 ttgacactta atgcactcgt catttgcata cgacagtagc attctgacca cacttgtacg 1921 ctgtaacctc atctacttct gatgttttta aaaaatgact tttaacaagg agagggaaaa 1981 gaaacccact aaattttgct ttgtttcctt gaagaatgtg gcaacactgt tttgtgattt 2041 tatttgtgca ggtcatgcac acagttttga taaagggcag taacaagtat tggggcctat 2101 ttttttttt tccacaagge attetetaaa getatgtgaa attetetg cacetetgta 2161 cagagaatac acctgeccet gtatateett tttteccecte cectecetee cagtggtact 2221 tetactaaat tgttgtettg ttttttattt tttaaataaa etgacaaatg acaaaatggt 2281 gagettatga tgtttacata aaagttetat aagetgtgta tacagttttt tatgtaaaat 

Homo sapiens/Ratus norvegicus/Mus musculus/Bos Taurus/Pan Tro. Homo sapiens/Ratus norvegicus/Gallus gallus/Bos Taurus/Pan Tro. Un des deux ARE canoniques de Westmark HuR binding sit>ST or AUUUA

**Figure Annexe 5B : Séquence nucléotidique de la région 3'UTR de** *rhoB*. Les séquences conservées entre plusieurs espèces sont indiquées en bleu et en rouge. La séquence surlignée en jaune correspond à la séquence identifiée par Westmark, sur laquelle la protéine HuR peut se lier. Les séquences riches en T ou en AT sur lesquelles de potentielles protéines de liaison aux ARNm pourraient venir se fixer, sont indiquées en rose et gris. Les signaux de polyadénylation sont indiqués en bleu turquoise.

# ANNEXE 6 :



**Figure Annexe 6 : La région 3'UTR de** *rhoB* **contient des éléments de séquence qui répriment l'expression d'un gène rapporteur situé en amont.** Les constructions RLuc et 3'UTR *rhoB* Rluc sont transfectées dans des cellules HaCat. 48h après, l'expression relative de la luciférase *renilla* par rapport à la luciférase *firefly* est mesurée.

# ANNEXE 7 :



**Figure Annexe 7 : La région 3'UTR de** *rhoB* **contient des éléments de séquence responsables de l'augmentation de l'expression de RhoB sous UV** Les constructions RLuc, 3'UTR *rhoB* Rluc et 3'UTR *P53* Rluc sont transfectées dans des cellules de kératinocytes primaires issus de deux donneurs différents, 16h avant d'être exposées aux UV. 8h après l'exposition aux UVB, l'expression relative de la luciférase *renilla* par rapport à la luciférase *firefly* est mesurée.

#### ANNEXE 8 :



#### Figure Annexe 8 : HuR réprime la traduction de *rhoB* dans différentes lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires (HaCat, A549 (adénocarcinome humain pulmonaire), 0vcar (adénocarcinome humain ovarien), MCF7 (adénocarcinome humain mammaire)) et les kératinocytes primaires humains sont transfectées avec un siRNA dirigé contre HuR. 48h après les extraits cellulaires sont analysés par Western blot avec les anticorps anti-RhoB, anti-HuR et anti-actine (A) et l'expression relative de l'ARNm de *rhoB* est analysée en RT-qPCR (B).

# ANNEXE 9:

# **EXTRACTION DES ARN TOTAUX PAR TRIZOL**

- Nettoyer les pipettes avec une solution nettoyante RNAse DNAse free
- Ajouter le trizol dans la boîte de culture (1ml de trizol pour 10cm<sup>2</sup> de surface)
- Homogénéiser avec une pipette pour casser l'ADN génomique
- Laisser 5min à température ambiante (stockage à -80°C possible)
- Ajouter du chloroforme (200µl par ml de trizol)
- Agiter très fortement à la main pendant 15 secondes
- Laisser 2 à 3 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 4°C pendant 15 min à 12 000g maximum
- Récupérer délicatement la phase acqueuse, non colorée
- Ajouter si nécéssaire de l'acrylamide linéaire (10 μg/ml de phase aqueuse) pour favoriser la précipitation
- Ajouter un volume d'isopropanol
- Mélanger à la main
- précipiter à 20° pendant toute une nuit ou 10 min à température ambiante
- centrifugation à 4° C pendant 30 min à 12 000 g
- enlever le surnageant
- ajouter 1ml d' EtOH 75°
- Agiter délicatement le tube à la main pour enlever toutes traces d'isopropanol ou de phénol
- Centrifugation à 4°C pendant 5 min à 7500 g
- retirer l'EtOH
- sécher le culot d'ARN
- redissoudre le culot dans de l'eau RNase free

# EXTRACTION DES ARN DES FRACTIONS POLYSOMIQUES (SUCROSE) : EXTRACTION TRIZOL LS

Le trizol LS est utilisé pour extraire des ARN à partir d'échantillons liquides.

- Nettoyer les pipettes avec une solution nettoyante RNAse DNAse free
- Ajouter 3 volumes de trizol LS pour un volume de liquide

- homogénéiser avec une pipette pour casser l'ADN génomique
- laisser 5 min à température ambiante (stockage à -80°C possible)
- ajouter du chloroforme (200 µL pour 750 µL de trizol LS)
- agitation forte à la main pendant 15 secondes
- laisser 3 à 5 min à température ambiante
- centrifugation à 4° pendant 15 min à 12 000 g maximum
- récupérer délicatement la phase acqueuse, non colorée ( ~70 % du volume de Trizol LS )
- Pour de petites quantités d'ARN extraits (<15 μg), ajouter de l'acrylamide linéaire (10 μg/ml de phase aqueuse)</li>
- ajouter de l'isopropanol (500 μL pour 750 μL de Trizol LS)
- mélanger à la main
- précipiter à 20° pendant toute une nuit ou 10 min à température ambiante
- centrifugation à 4° C pendant 30 min à 12 000 g
- retirer le surnageant
- ajouter de l' EtOH 75° (1 ml pour 750 µL Trizol LS)
- Agiter délicatement le tube à la main pour enlever toute trace d'isopropanol ou de phénol
- Centrifugation à 4°C pendant 5 min à 7500 g
- retirer l'EtOH
- sécher le culot d'ARN
- redissoudre le culot dans de l'eau RNase free

Doser au spectrophotomètre. Déposer sur un gel d'agarose 1%, TBE 0,5X pour vérifier l'intégrité des ARN. Si plusieurs extractions sont réalisées pour une même expérience, déposer la même quantité (0,5µg) de chaque ARN sur le gel d'agarose pour vérifier également le dosage.

# Références

#### А

- Abdelmohsen, K., E. R. Hutchison, et al. (2010). "miR-375 inhibits differentiation of neurites by lowering HuD levels." <u>Mol Cell Biol</u> 30(17): 4197-210.PMID: 20584986.
- Abdelmohsen, K., R. Pullmann, Jr., et al. (2007). "Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression." <u>Mol Cell</u> 25(4): 543-57.PMID: 17317627.
- Abdelmohsen, K., S. Srikantan, et al. (2008). "miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 105(51): 20297-302.PMID: 19088191.
- Adamson, P., H. F. Paterson, et al. (1992). "Intracellular localization of the P21rho proteins." <u>I Cell Biol</u> 119(3): 617-27.PMID: 1383236.
- Ader, I., C. Delmas, et al. (2003). "Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts." <u>Oncogene</u> 22(55): 8861-9.PMID: 14654782.
- Ader, I., C. Toulas, et al. (2002). "RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death." <u>Oncogene</u> 21(39): 5998-6006.PMID: 12203112.
- Adnane, J., C. Muro-Cacho, et al. (2002). "Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients." <u>Clin Cancer Res</u> 8(7): 2225-32.PMID: 12114424.
- Anantharaman, V., E. V. Koonin, et al. (2002). "Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism." <u>Nucleic Acids Res</u> 30(7): 1427-64.PMID: 11917006.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2002). "Stressful initiations." <u>J Cell Sci</u> 115(Pt 16): 3227-34.PMID: 12140254.

- Anderson, P. and N. Kedersha (2002). "Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation." <u>Cell Stress Chaperones</u> 7(2): 213-21.PMID: 12380690.
- Antic, D. and J. D. Keene (1997). "Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression." <u>Am J</u> <u>Hum Genet</u> 61(2): 273-8.PMID: 9311730.
- Arao, Y., R. Kuriyama, et al. (2000). "A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D." <u>Arch Biochem Biophys</u> 380(2): 228-36.PMID: 10933876.

#### В

- Baek, D., J. Villen, et al. (2008). "The impact of microRNAs on protein output." <u>Nature</u> 455(7209): 64-71.PMID: 18668037.
- Bagga, S., J. Bracht, et al. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." <u>Cell</u> 122(4): 553-63.PMID: 16122423.
- Bakheet, T., B. R. Williams, et al. (2003). "ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database." <u>Nucleic Acids Res</u> 31(1): 421-3.PMID: 12520039.
- Baldwin, R. M., D. A. Parolin, et al. (2008). "Regulation of glioblastoma cell invasion by PKC iota and RhoB." <u>Oncogene</u> 27(25): 3587-95.PMID: 18212741.
- Banihashemi, L., G. M. Wilson, et al. (2006). "Upf1/Upf2 regulation of 3' untranslated region splice variants of AUF1 links nonsense-mediated and A+U-rich element-mediated mRNA decay." <u>Mol Cell Biol</u> 26(23): 8743-54.PMID: 17000771.
- Baron, R., E. Fourcade, et al. (2000). "RhoB prenylation is driven by the three carboxylterminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 97(21): 11626-31.PMID: 11027361.

- Barreau, C., L. Paillard, et al. (2006). "Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions." <u>Biochimie</u> 88(5): 515-25.PMID: 16480813.
- Barreau, C., L. Paillard, et al. (2005). "AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?" <u>Nucleic Acids Res</u> 33(22): 7138-50.PMID: 16391004.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, et al. (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." <u>Genes</u> <u>Dev</u> 20(14): 1885-98.PMID: 16815998.
- Beitzinger, M. and G. Meister (2010). "Preview. MicroRNAs: from decay to decoy." <u>Cell</u> 140(5): 612-4.PMID: 20211130.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." <u>Cell</u> 125(6): 1111-24.PMID: 16777601.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells." <u>Cold Spring Harb Symp</u> <u>Quant Biol</u> 71: 513-21.PMID: 17381334.
- Blais, J. D., V. Filipenko, et al. (2004). "Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress." <u>Mol Cell Biol</u> 24(17): 7469-82.PMID: 15314157.
- Borchert, G. M., W. Lanier, et al. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." <u>Nat Struct Mol Biol</u> 13(12): 1097-101.PMID: 17099701.
- Boureux, A., E. Vignal, et al. (2007). "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes." <u>Mol Biol Evol</u> 24(1): 203-16.PMID: 17035353.
- Bousquet, E., J. Mazieres, et al. (2009). "Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1." <u>Cancer Res</u> 69(15): 6092-9.PMID: 19602596.

- Brennan, C. M., I. E. Gallouzi, et al. (2000). "Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo." <u>J Cell Biol</u> 151(1): 1-14.PMID: 11018049.
- Brennan, C. M. and J. A. Steitz (2001). "HuR and mRNA stability." <u>Cell Mol Life Sci</u> 58(2): 266-77.PMID: 11289308.
- Brennecke, J., A. Stark, et al. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." <u>PLoS</u> <u>Biol</u> 3(3): e85.PMID: 15723116.
- Breving, K. and A. Esquela-Kerscher (2010). "The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules." <u>Int J Biochem Cell Biol</u> 42(8): 1316-29.PMID: 19800023.
- Brewer, G. (1991). "An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro." <u>Mol Cell Biol</u> 11(5): 2460-6.PMID: 1901943.
- Brosens, L. A., J. J. Keller, et al. (2008). "Increased expression of cytoplasmic HuR in familial adenomatous polyposis." <u>Cancer Biol Ther</u> 7(3): 424-7.PMID: 18094611.
- Bushell, M., D. Poncet, et al. (2000). "Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage." <u>Cell Death Differ</u> 7(7): 628-36.PMID: 10889507.
- Bushell, M., M. Stoneley, et al. (2006). "Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis." <u>Mol Cell</u> 23(3): 401-12.PMID: 16885029.
- Buttgereit, F. and M. D. Brand (1995). "A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells." <u>Biochem J</u> 312 (Pt 1): 163-7.PMID: 7492307.

С

Cammas, A., S. M. Lewis, et al. (2008). "Post-transcriptional control of gene expression through subcellular relocalization of mRNA binding proteins." <u>Biochem</u> <u>Pharmacol</u>.PMID: 18582437.

- Cammas, A., F. Pileur, et al. (2007). "Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs." <u>Mol Biol Cell</u> 18(12): 5048-59.PMID: 17898077.
- Canguilhem, B., A. Pradines, et al. (2005). "RhoB protects human keratinocytes from UVBinduced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling." <u>J Biol Chem</u> 280(52): 43257-63.PMID: 16278215.
- Cannizzaro, L. A., P. Madaule, et al. (1990). "Chromosome localization of human ARH genes, a ras-related gene family." <u>Genomics</u> 6(2): 197-203.PMID: 2407642.
- Caput, D., B. Beutler, et al. (1986). "Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 83(6): 1670-4.PMID: 2419912.
- Chan, S. P. and F. J. Slack (2007). "And now introducing mammalian mirtrons." <u>Dev Cell</u> 13(5): 605-7.PMID: 17981129.
- Chang, N., J. Yi, et al. (2010). "HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay." <u>Mol Cell Biol</u> 30(15): 3875-86.PMID: 20498276.
- Charlesworth, A., L. L. Cox, et al. (2004). "Cytoplasmic polyadenylation element (CPE)- and CPE-binding protein (CPEB)-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in Xenopus oocytes." J Biol Chem 279(17): 17650-9.PMID: 14752101.
- Chatterjee, S. and J. K. Pal (2009). "Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases." <u>Biol Cell</u> 101(5): 251-62.PMID: 19275763.
- Chen, C. Y., R. Gherzi, et al. (2001). "AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs." <u>Cell</u> 107(4): 451-64.PMID: 11719186.
- Chen, C. Y. and A. B. Shyu (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." <u>Trends Biochem Sci</u> 20(11): 465-70.PMID: 8578590.

- Chen, C. Y., N. Xu, et al. (2002). "Highly selective actions of HuR in antagonizing AU-rich element-mediated mRNA destabilization." <u>Mol Cell Biol</u> 22(20): 7268-78.PMID: 12242302.
- Chen, Y. X., Z. B. Li, et al. (2006). "Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF-kappaB transcriptional activity." <u>J Steroid Biochem</u> <u>Mol Biol</u> 101(4-5): 179-87.PMID: 17046241.
- Chen, Z., J. Sun, et al. (2000). "Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 275(24): 17974-8.PMID: 10770919.
- Chendrimada, T. P., K. J. Finn, et al. (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." <u>Nature</u> 447(7146): 823-8.PMID: 17507929.
- Cimbora-Zovko, T., G. Fritz, et al. (2010). "Downregulation of RhoB GTPase confers resistance to cisplatin in human laryngeal carcinoma cells." <u>Cancer Lett</u> 295(2): 182-90.PMID: 20303648.
- Clemens, M. J. (2001). "Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins." <u>J Cell Mol Med</u> 5(3): 221-39.PMID: 12067482.
- Clemens, M. J., M. Bushell, et al. (2000). "Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells." <u>Cell Death Differ</u> 7(7): 603-15.PMID: 10889505.
- Connolly, E. C., K. Van Doorslaer, et al. (2010). "Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB." <u>Mol Cancer</u> <u>Res</u> 8(5): 691-700.PMID: 20460403.
- Couderc, B., A. Pradines, et al. (2008). "In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression." <u>Cancer Gene Ther</u> 15(7): 456-64.PMID: 18340357.

D

- Danilin, S., C. Sourbier, et al. (2010). "Role of the RNA-binding protein HuR in human renal cell carcinoma." <u>Carcinogenesis</u> 31(6): 1018-26.PMID: 20219773.
- de Cremoux, P., C. Gauville, et al. (1994). "EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines." <u>Int J Cancer</u> 59(3): 408-15.PMID: 7927950.
- Del Gatto-Konczak, F., C. F. Bourgeois, et al. (2000). "The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site." <u>Mol Cell Biol</u> 20(17): 6287-99.PMID: 10938105.
- Delarue, F. L., J. Adnane, et al. (2007). "Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter." <u>Oncogene</u> 26(5): 633-40.PMID: 16909123.
- Delmas, C., C. Heliez, et al. (2002). "Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation." <u>Int J Cancer</u> 100(1): 43-8.PMID: 12115585.
- Dember, L. M., N. D. Kim, et al. (1996). "Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities." <u>J Biol Chem</u> 271(5): 2783-8.PMID: 8576255.
- Deng, J., H. P. Harding, et al. (2002). "Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation." <u>Curr Biol</u> 12(15): 1279-86.PMID: 12176355.
- Dever, T. E. (2002). "Gene-specific regulation by general translation factors." <u>Cell</u> 108(4): 545-56.PMID: 11909525.
- Diaz-Moreno, I., D. Hollingworth, et al. (2010). "Orientation of the central domains of KSRP and its implications for the interaction with the RNA targets." <u>Nucleic Acids Res</u> 38(15): 5193-205.PMID: 20385598.

- Diederichs, S. and D. A. Haber (2007). "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression." <u>Cell</u> 131(6): 1097-108.PMID: 18083100.
- Diederichs, S., S. Jung, et al. (2008). "Coexpression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 105(27): 9284-9.PMID: 18591665.
- Diosdado, B., M. A. van de Wiel, et al. (2009). "MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression." <u>Br J Cancer</u> 101(4): 707-14.PMID: 19672269.
- Dixon, D. A., G. C. Balch, et al. (2003). "Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1." <u>J Exp Med</u> 198(3): 475-81.PMID: 12885872.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." <u>Genes Dev</u> 18(5): 504-11.PMID: 15014042.
- Doller, A., S. Akool el, et al. (2008). "Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA." <u>Mol Cell Biol</u> 28(8): 2608-25.PMID: 18285462.
- Doller, A., A. Huwiler, et al. (2007). "Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2." <u>Mol Biol Cell</u> 18(6): 2137-48.PMID: 17392515.
- Doller, A., K. Schlepckow, et al. (2010). "Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR." <u>Mol Cell Biol</u> 30(6): 1397-410.PMID: 20086103.
- Du, W. and G. C. Prendergast (1999). "Geranylgeranylated RhoB mediates suppression of human tumor cell growth by farnesyltransferase inhibitors." <u>Cancer Res</u> 59(21): 5492-6.PMID: 10554025.

- Eiring, A. M., J. G. Harb, et al. (2010). "miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts." <u>Cell</u> 140(5): 652-65.PMID: 20211135.
- Engel, M. E., P. K. Datta, et al. (1998). "RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation." <u>J Biol Chem</u> 273(16): 9921-6.PMID: 9545335.
- Ernst, A., B. Campos, et al. (2010). "De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures." <u>Oncogene</u> 29(23): 3411-22.PMID: 20305691.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> 8(1): 9-22.PMID: 17183357.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." <u>Cell</u> 132(1): 9-14.PMID: 18191211.
- Eulalio, A., J. Rehwinkel, et al. (2007). "Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing." <u>Genes Dev</u> 21(20): 2558-70.PMID: 17901217.

### F

- Fabian, M. R., N. Sonenberg, et al. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." <u>Annu Rev Biochem</u> 79: 351-79.PMID: 20533884.
- Fan, X. C. and J. A. Steitz (1998). "HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 95(26): 15293-8.PMID: 9860962.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" <u>Nat Rev Genet</u> 9(2): 102-14.PMID: 18197166.
- Forch, P., O. Puig, et al. (2000). "The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing." <u>Mol Cell</u> 6(5): 1089-98.PMID: 11106748.

- Forget, M. A., R. R. Desrosiers, et al. (2002). "The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers." <u>Clin Exp Metastasis</u> 19(1): 9-15.PMID: 11918088.
- Fox, J. T., W. K. Shin, et al. (2009). "A UV-responsive internal ribosome entry site enhances serine hydroxymethyltransferase 1 expression for DNA damage repair." <u>J Biol Chem</u> 284(45): 31097-108.PMID: 19734144.
- Fox, J. T. and P. J. Stover (2009). "Mechanism of the internal ribosome entry site-mediated translation of serine hydroxymethyltransferase 1." J Biol Chem 284(45): 31085-96.PMID: 19734143.
- Fritz, G., C. Brachetti, et al. (2002). "Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters." <u>Br J Cancer</u> 87(6): 635-44.PMID: 12237774.
- Fritz, G. and B. Kaina (1997). "rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTPbinding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase." <u>J Biol Chem</u> 272(49): 30637-44.PMID: 9388198.
- Fritz, G. and B. Kaina (2000). "Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 268(3): 784-9.PMID: 10679283.
- Fritz, G. and B. Kaina (2001). "Ras-related GTPase Rhob represses NF-kappaB signaling." J Biol Chem 276(5): 3115-22.PMID: 11062238.
- Fritz, G. and B. Kaina (2001). "Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element." <u>Nucleic Acids Res</u> 29(3): 792-8.PMID: 11160903.
- Fritz, G., B. Kaina, et al. (1995). "The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments." <u>J Biol Chem</u> 270(42): 25172-7.PMID: 7559652.

Fujimura, K., F. Kano, et al. (2008). "Dual localization of the RNA binding protein CUGBP-1 to stress granule and perinucleolar compartment." <u>Exp Cell Res</u> 314(3): 543-53.PMID: 18164289.

### G

- Galban, S., Y. Kuwano, et al. (2008). "RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha." <u>Mol Cell Biol</u> 28(1): 93-107.PMID: 17967866.
- Galban, S., J. L. Martindale, et al. (2003). "Influence of the RNA-binding protein HuR in pVHL-regulated p53 expression in renal carcinoma cells." <u>Mol Cell Biol</u> 23(20): 7083-95.PMID: 14517280.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, et al. (2003). "Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock." <u>RNA</u> 9(11): 1410.PMID: 14561890.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, et al. (2000). "HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 97(7): 3073-8.PMID: 10737787.
- Gallouzi, I. E. and J. A. Steitz (2001). "Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides." <u>Science</u> 294(5548): 1895-901.PMID: 11729309.
- Garcia-Mayoral, M. F., I. Diaz-Moreno, et al. (2008). "The sequence selectivity of KSRP explains its flexibility in the recognition of the RNA targets." <u>Nucleic Acids Res</u> 36(16): 5290-6.PMID: 18684992.
- Garcia-Mayoral, M. F., D. Hollingworth, et al. (2007). "The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation." <u>Structure</u> 15(4): 485-98.PMID: 17437720.
- Gebauer, F. and M. W. Hentze (2004). "Molecular mechanisms of translational control." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> 5(10): 827-35.PMID: 15459663.

- Gebeshuber, C. A., K. Zatloukal, et al. (2009). "miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis." <u>EMBO Rep</u> 10(4): 400-5.PMID: 19247375.
- Gherzi, R., K. Y. Lee, et al. (2004). "A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery." <u>Mol Cell</u> 14(5): 571-83.PMID: 15175153.
- Giraldez, A. J., Y. Mishima, et al. (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." <u>Science</u> 312(5770): 75-9.PMID: 16484454.
- Good, P. J., Q. Chen, et al. (2000). "A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator." J Biol Chem 275(37): 28583-92.PMID: 10893231.
- Grimson, A., K. K. Farh, et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." <u>Mol Cell</u> 27(1): 91-105.PMID: 17612493.
- Gross, J. D., N. J. Moerke, et al. (2003). "Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E." <u>Cell</u> 115(6): 739-50.PMID: 14675538.
- Grosset, C., R. Boniface, et al. (2004). "In vivo studies of translational repression mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element." J Biol Chem 279(14): 13354-62.PMID: 14726527.
- Gueydan, C., L. Droogmans, et al. (1999). "Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA." J <u>Biol Chem</u> 274(4): 2322-6.PMID: 9890998.
- Guil, S. and J. F. Caceres (2007). "The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a." <u>Nat Struct Mol Biol</u> 14(7): 591-6.PMID: 17558416.
- Guo, X., Y. Wu, et al. (2009). "MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer." <u>RNA Biol</u> 6(5): 575-83.PMID: 19875930.

Guttinger, S., P. Muhlhausser, et al. (2004). "Transportin2 functions as importin and mediates nuclear import of HuR." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(9): 2918-23.PMID: 14981248.

### Η

- Hagele, S., U. Kuhn, et al. (2009). "Cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1alpha mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1alpha protein expression." <u>Biochem J</u> 417(1): 235-46.PMID: 18752464.
- Han, J., T. Brown, et al. (1990). "Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level." J Exp Med 171(2): 465-75.PMID: 2303781.
- Han, J., Y. Lee, et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." <u>Cell</u> 125(5): 887-901.PMID: 16751099.
- Hau, H. H., R. J. Walsh, et al. (2007). "Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences." <u>J Cell Biochem</u> 100(6): 1477-92.PMID: 17133347.
- Hayashita, Y., H. Osada, et al. (2005). "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation." <u>Cancer Res</u> 65(21): 9628-32.PMID: 16266980.
- He, L., J. M. Thomson, et al. (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." <u>Nature</u> 435(7043): 828-33.PMID: 15944707.
- Heinonen, M., P. Bono, et al. (2005). "Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma." <u>Cancer Res</u> 65(6): 2157-61.PMID: 15781626.
- Heinonen, M., R. Fagerholm, et al. (2007). "Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer." <u>Clin Cancer Res</u> 13(23): 6959-63.PMID: 18056170.
- Hershey, J. W. (1991). "Translational control in mammalian cells." <u>Annu Rev Biochem</u> 60: 717-55.PMID: 1883206.
- Hieronymus, H. and P. A. Silver (2004). "A systems view of mRNP biology." <u>Genes Dev</u> 18(23): 2845-60.PMID: 15574591.
- Hinman, M. N. and H. Lou (2008). "Diverse molecular functions of Hu proteins." <u>Cell Mol</u> <u>Life Sci</u> 65(20): 3168-81.PMID: 18581050.
- Hock, J., L. Weinmann, et al. (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonautecontaining mRNA-protein complexes in human cells." <u>EMBO Rep</u> 8(11): 1052-60.PMID: 17932509.
- Holcik, M. and N. Sonenberg (2005). "Translational control in stress and apoptosis." <u>Nat</u> <u>Rev Mol Cell Biol</u> 6(4): 318-27.PMID: 15803138.
- Huang, M., U. Kamasani, et al. (2006). "RhoB facilitates c-Myc turnover by supporting efficient nuclear accumulation of GSK-3." <u>Oncogene</u> 25(9): 1281-9.PMID: 16247449.
- Hutvagner, G. (2005). "Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation." <u>FEBS Lett</u> 579(26): 5850-7.PMID: 16199039.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." <u>Science</u> 293(5531): 834-8.PMID: 11452083.
- Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> 9(1): 22-32.PMID: 18073770.

I - J

- Ishimaru, D., L. Zuraw, et al. (2010). "Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1)." J Biol Chem 285(35): 27182-91.PMID: 20571027.
- Jahner, D. and T. Hunter (1991). "The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts." <u>Mol Cell Biol</u> 11(7): 3682-90.PMID: 1710770.

- Jeffrey, I. W., M. Bushell, et al. (2002). "Inhibition of protein synthesis in apoptosis: differential requirements by the tumor necrosis factor alpha family and a DNAdamaging agent for caspases and the double-stranded RNA-dependent protein kinase." <u>Cancer Res</u> 62(8): 2272-80.PMID: 11956083.
- Jiang, H. Y. and R. C. Wek (2005). "GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NFkappaB in response to UV irradiation." <u>Biochem J</u> 385(Pt 2): 371-80.PMID: 15355306.
- Jiang, K., F. L. Delarue, et al. (2004). "EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation." <u>Oncogene</u> 23(5): 1136-45.PMID: 14647415.
- Jiang, K., J. Sun, et al. (2004). "Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis." <u>Mol Cell Biol</u> 24(12): 5565-76.PMID: 15169915.
- Jing, Q., S. Huang, et al. (2005). "Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability." <u>Cell</u> 120(5): 623-34.PMID: 15766526.
- Jo, O. D., J. Martin, et al. (2008). "hnRNP A1 regulates cyclin D1 and c-myc IRES function through Akt signaling." <u>J Biol Chem</u>.PMID: 18562319.
- Johannes, G., M. S. Carter, et al. (1999). "Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96(23): 13118-23.PMID: 10557283.
- Johannes, G. and P. Sarnow (1998). "Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites." <u>RNA</u> 4(12): 1500-13.PMID: 9848649.
- Jones-Rhoades, M. W., D. P. Bartel, et al. (2006). "MicroRNAS and their regulatory roles in plants." <u>Annu Rev Plant Biol</u> 57: 19-53.PMID: 16669754.

К

- Kajita, Y., J. Nakayama, et al. (1995). "The UUAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0. Common modular structure and binding properties of the 2xRBD-Gly family." <u>J Biol Chem</u> 270(38): 22167-75.PMID: 7673195.
- Kandasamy, K., K. Joseph, et al. (2005). "Translational control of beta2-adrenergic receptor mRNA by T-cell-restricted intracellular antigen-related protein." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 280(3): 1931-43.PMID: 15536087.
- Karaa, Z. S., J. S. Iacovoni, et al. (2009). "The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16." <u>RNA</u> 15(2): 249-54.PMID: 19144909.
- Karim, M. M., J. M. Hughes, et al. (2001). "A quantitative molecular model for modulation of mammalian translation by the eIF4E-binding protein 1." <u>J Biol Chem</u> 276(23): 20750-7.PMID: 11278829.
- Katsanou, V., O. Papadaki, et al. (2005). "HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation." <u>Mol Cell</u> 19(6): 777-89.PMID: 16168373.
- Kawai, T., A. Lal, et al. (2006). "Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR." <u>Mol Cell Biol</u> 26(8): 3295-307.PMID: 16581801.
- Kawakami, A., Q. Tian, et al. (1992). "Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 89(18): 8681-5.PMID: 1326761.
- Kedde, M., M. J. Strasser, et al. (2007). "RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA." <u>Cell</u> 131(7): 1273-86.PMID: 18155131.
- Kedersha, N. and P. Anderson (2002). "Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability." <u>Biochem Soc Trans</u> 30(Pt 6): 963-9.PMID: 12440955.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, et al. (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> 147(7): 1431-42.PMID: 10613902.

- Keene, J. D. (2007). "RNA regulons: coordination of post-transcriptional events." <u>Nat Rev</u> <u>Genet</u> 8(7): 533-43.PMID: 17572691.
- Keene, J. D. (2010). "Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic Acid." <u>Endocrinology</u> 151(4): 1391-7.PMID: 20332203.
- Keene, J. D. and S. A. Tenenbaum (2002). "Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons." <u>Mol Cell</u> 9(6): 1161-7.PMID: 12086614.
- Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." <u>Cell</u> 115(2): 209-16.PMID: 14567918.
- Kim, B. K., D. M. Kim, et al. (2010). "NSC126188, a piperazine alkyl derivative, induces apoptosis via upregulation of RhoB in HeLa cells." <u>Invest New Drugs</u>.PMID: 20432054.
- Kim, C. H., M. Won, et al. (2010). "Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> 391(2): 1182-6.PMID: 19995557.
- Kim, D. M., M. Won, et al. (2010). "JNK-mediated transcriptional upregulation of RhoB is critical for apoptosis of HCT-116 colon cancer cells by a novel diarylsulfonylurea derivative." <u>Apoptosis</u>.PMID: 20683666.
- Kim, H. H., K. Abdelmohsen, et al. (2008). "Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1." <u>Genes Dev</u> 22(13): 1804-15.PMID: 18593881.
- Kim, H. H. and M. Gorospe (2008). "GU-rich RNA: expanding CUGBP1 function, broadening mRNA turnover." <u>Mol Cell</u> 29(2): 151-2.PMID: 18243108.
- Kim, H. H., Y. Kuwano, et al. (2009). "HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression." <u>Genes Dev</u> 23(15): 1743-8.PMID: 19574298.
- Kim, H. S., Y. Kuwano, et al. (2007). "Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR." <u>Mol Cell Biol</u> 27(19): 6806-17.PMID: 17682065.

- Kiriakidou, M., G. S. Tan, et al. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." <u>Cell</u> 129(6): 1141-51.PMID: 17524464.
- Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, et al. (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." <u>Nature</u> 438(7068): 685-9.PMID: 16258535.
- Kruys, V., O. Marinx, et al. (1989). "Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences." <u>Science</u> 245(4920): 852-5.PMID: 2672333.
- Kullmann, M., U. Gopfert, et al. (2002). "ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR." <u>Genes Dev</u> 16(23): 3087-99.PMID: 12464637.
- Kuwano, Y., H. H. Kim, et al. (2008). "MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90." <u>Mol Cell Biol</u> 28(14): 4562-75.PMID: 18490444.

L

- Ladd, A. N. and T. A. Cooper (2004). "Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events." <u>J Cell Sci</u> 117(Pt 16): 3519-29.PMID: 15226369.
- Lai, W. S. and P. J. Blackshear (2001). "Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail." <u>J Biol Chem</u> 276(25): 23144-54.PMID: 11279239.
- Lai, W. S., E. Carballo, et al. (2000). "Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA." <u>I Biol Chem</u> 275(23): 17827-37.PMID: 10751406.
- Lai, W. S., J. S. Parker, et al. (2006). "Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts." <u>Mol Cell Biol</u> 26(24): 9196-208.PMID: 17030620.

- Lal, A., K. Abdelmohsen, et al. (2006). "Posttranscriptional derepression of GADD45alpha by genotoxic stress." <u>Mol Cell</u> 22(1): 117-28.PMID: 16600875.
- Lal, A., T. Kawai, et al. (2005). "Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha." <u>EMBO J</u> 24(10): 1852-62.PMID: 15861128.
- Lal, A., K. Mazan-Mamczarz, et al. (2004). "Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs." <u>EMBO J</u> 23(15): 3092-102.PMID: 15257295.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." <u>Nature</u> 409(6822): 860-921.PMID: 11237011.
- Le Guiner, C., F. Lejeune, et al. (2001). "TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own premRNAs." <u>J Biol Chem</u> 276(44): 40638-46.PMID: 11514562.
- Lebowitz, P. F., P. J. Casey, et al. (1997). "Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB." <u>J Biol Chem</u> 272(25): 15591-4.PMID: 9188444.
- Lebowitz, P. F., W. Du, et al. (1997). "Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription." J Biol Chem 272(26): 16093-5.PMID: 9195903.
- Lee, J. E., J. Y. Lee, et al. (2010). "Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells." <u>PLoS</u> <u>One</u> 5(6): e11201.PMID: 20574513.
- Levine, T. D., F. Gao, et al. (1993). "Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs." <u>Mol</u> <u>Cell Biol</u> 13(6): 3494-504.PMID: 8497264.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." <u>Cell</u> 115(7): 787-98.PMID: 14697198.

- Lewis, J. D., S. I. Gunderson, et al. (1995). "The influence of 5' and 3' end structures on premRNA metabolism." <u>J Cell Sci Suppl</u> 19: 13-9.PMID: 8655642.
- Li, B., J. Si, et al. (2008). "Ultraviolet radiation (UVR) activates p38 MAP kinase and induces post-transcriptional stabilization of the C/EBPdelta mRNA in G0 growth arrested mammary epithelial cells." <u>J Cell Biochem</u> 103(5): 1657-69.PMID: 17902160.
- Li, H., S. Park, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNAstabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase." J <u>Biol Chem</u> 277(47): 44623-30.PMID: 12237300.
- Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." <u>Nature</u> 433(7027): 769-73.PMID: 15685193.
- Lim, S. J., S. H. Lee, et al. (2009). "Cytoplasmic expression of HuR is related to cyclooxygenase-2 expression in colon cancer." <u>Cancer Res Treat</u> 41(2): 87-92.PMID: 19707506.
- Ling, J., S. J. Morley, et al. (2005). "Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2." <u>EMBO J</u> 24(23): 4094-105.PMID: 16281055.
- Liu, A., G. J. Cerniglia, et al. (2001). "RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 98(11): 6192-7.PMID: 11353846.
- Liu, A., W. Du, et al. (2000). "RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors." <u>Mol Cell Biol</u> 20(16): 6105-13.PMID: 10913192.
- Liu, A. and G. C. Prendergast (2000). "Geranylgeranylated RhoB is sufficient to mediate tissue-specific suppression of Akt kinase activity by farnesyltransferase inhibitors." <u>FEBS Lett</u> 481(3): 205-8.PMID: 11007964.

- Liu, L., J. N. Rao, et al. (2009). "Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2dependent HuR phosphorylation." <u>Mol Biol Cell</u> 20(23): 4885-98.PMID: 19812253.
- Loflin, P., C. Y. Chen, et al. (1999). "Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element." <u>Genes Dev</u> 13(14): 1884-97.PMID: 10421639.
- Lopez de Silanes, I., J. Fan, et al. (2003). "Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis." <u>Oncogene</u> 22(46): 7146-54.PMID: 14562043.
- Lopez de Silanes, I., A. Lal, et al. (2005). "HuR: post-transcriptional paths to malignancy." <u>RNA Biol</u> 2(1): 11-3.PMID: 17132932.
- Lopez de Silanes, I., M. Zhan, et al. (2004). "Identification of a target RNA motif for RNAbinding protein HuR." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(9): 2987-92.PMID: 14981256.
- Lu, X., N. A. Timchenko, et al. (1999). "Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy." <u>Hum Mol Genet</u> 8(1): 53-60.PMID: 9887331.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." <u>Science</u> 303(5654): 95-8.PMID: 14631048.
- Lunde, B. M., C. Moore, et al. (2007). "RNA-binding proteins: modular design for efficient function." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> 8(6): 479-90.PMID: 17473849.
- Lykke-Andersen, J. and E. Wagner (2005). "Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1." <u>Genes Dev</u> 19(3): 351-61.PMID: 15687258.

Μ

- Ma, W. J., S. Cheng, et al. (1996). "Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein." <u>J Biol Chem</u> 271(14): 8144-51.PMID: 8626503.
- Ma, W. J. and H. Furneaux (1997). "Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2." <u>Hum Genet</u> 99(1): 32-3.PMID: 9003489.

- Malcolm, T., E. Ettehadieh, et al. (2003). "Mitogen-responsive expression of RhoB is regulated by RNA stability." <u>Oncogene</u> 22(40): 6142-50.PMID: 13679852.
- Maniatis, T. and R. Reed (2002). "An extensive network of coupling among gene expression machines." <u>Nature</u> 416(6880): 499-506.PMID: 11932736.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1999). "Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G." <u>Mol Cell</u> 3(6): 707-16.PMID: 10394359.
- Marissen, W. E., A. Gradi, et al. (2000). "Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII correlates with translation inhibition during apoptosis." <u>Cell Death Differ</u> 7(12): 1234-43.PMID: 11175261.
- Matsuoka, S., G. Rotman, et al. (2000). "Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 97(19): 10389-94.PMID: 10973490.
- Mavrakis, K. J., A. L. Wolfe, et al. (2010). "Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia." <u>Nat Cell Biol</u> 12(4): 372-9.PMID: 20190740.
- Mazan-Mamczarz, K., S. Galban, et al. (2003). "RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 100(14): 8354-9.PMID: 12821781.
- Mazan-Mamczarz, K., T. Kawai, et al. (2005). "En masse analysis of nascent translation using microarrays." <u>Biotechniques</u> 39(1): 61-2, 64, 66-7.PMID: 16060370.
- Mazan-Mamczarz, K., A. Lal, et al. (2006). "Translational repression by RNA-binding protein TIAR." <u>Mol Cell Biol</u> 26(7): 2716-27.PMID: 16537914.
- Mazieres, J., T. Antonia, et al. (2004). "Loss of RhoB expression in human lung cancer progression." <u>Clin Cancer Res</u> 10(8): 2742-50.PMID: 15102679.

- Mazieres, J., V. Tillement, et al. (2005). "Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells." <u>Exp Cell Res</u> 304(2): 354-64.PMID: 15748883.
- Mazieres, J., D. Tovar, et al. (2007). "Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer." <u>BMC Cancer</u> 7: 220.PMID: 18047684.
- Meng, Z., P. H. King, et al. (2005). "The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses capdependent and IRES-mediated translation." <u>Nucleic Acids Res</u> 33(9): 2962-79.PMID: 15914670.
- Michaelson, D., J. Silletti, et al. (2001). "Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding." <u>J Cell Biol</u> 152(1): 111-26.PMID: 11149925.
- Michlewski, G. and J. F. Caceres (2010). "Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis." <u>Nat Struct Mol Biol</u> 17(8): 1011-8.PMID: 20639884.
- Michlewski, G., S. Guil, et al. (2008). "Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops." <u>Mol Cell</u> 32(3): 383-93.PMID: 18995836.
- Mignone, F., C. Gissi, et al. (2002). "Untranslated regions of mRNAs." <u>Genome Biol</u> 3(3): REVIEWS0004.PMID: 11897027.
- Milia, J., F. Teyssier, et al. (2005). "Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication." <u>Cell Death</u> <u>Differ</u> 12(5): 492-501.PMID: 15776002.
- Millevoi, S., A. Decorsiere, et al. (2009). "A physical and functional link between splicing factors promotes pre-mRNA 3' end processing." <u>Nucleic Acids Res</u> 37(14): 4672-83.PMID: 19506027.
- Millevoi, S., C. Loulergue, et al. (2006). "An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries." <u>EMBO J</u> 25(20): 4854-64.PMID: 17024186.

- Mitchell, S. A., K. A. Spriggs, et al. (2005). "Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry." <u>Genes</u> <u>Dev</u> 19(13): 1556-71.PMID: 15998809.
- Mitchell, S. A., K. A. Spriggs, et al. (2003). "The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr." <u>Mol Cell</u> 11(3): 757-71.PMID: 12667457.
- Monferran, S., N. Skuli, et al. (2008). "Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB." <u>Int J Cancer</u> 123(2): 357-64.PMID: 18464290.
- Moore, M. J. (2005). "From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs." <u>Science</u> 309(5740): 1514-8.PMID: 16141059.
- Moraes, K. C., C. J. Wilusz, et al. (2006). "CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase." <u>RNA</u> 12(6): 1084-91.PMID: 16601207.
- Morley, S. J., M. J. Coldwell, et al. (2005). "Initiation factor modifications in the preapoptotic phase." <u>Cell Death Differ</u> 12(6): 571-84.PMID: 15900314.
- Mukhopadhyay, D., C. W. Houchen, et al. (2003). "Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2." <u>Mol Cell</u> 11(1): 113-26.PMID: 12535526.
- Myer, V. E., X. C. Fan, et al. (1997). "Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay." <u>EMBO J</u> 16(8): 2130-9.PMID: 9155038.

Ν

Nakamura, T., M. Asano, et al. (1996). "Cloning of the RhoB gene from the mouse genome and characterization of its promoter region." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 226(3): 688-94.PMID: 8831676.

- Nechama, M., Y. Peng, et al. (2009). "KSRP-PMR1-exosome association determines parathyroid hormone mRNA levels and stability in transfected cells." <u>BMC Cell Biol</u> 10: 70.PMID: 19775426.
- Nielsen, C. B., N. Shomron, et al. (2007). "Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs." <u>RNA</u> 13(11): 1894-910.PMID: 17872505.
- Nottrott, S., M. J. Simard, et al. (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." <u>Nat Struct Mol Biol</u> 13(12): 1108-14.PMID: 17128272.

## 0

- O'Carroll, D., I. Mecklenbrauker, et al. (2007). "A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway." <u>Genes Dev</u> 21(16): 1999-2004.PMID: 17626790.
- Ogilvie, R. L., J. R. Sternjohn, et al. (2009). "Tristetraprolin mediates interferon-gamma mRNA decay." J Biol Chem 284(17): 11216-23.PMID: 19258311.
- Olive, V., M. J. Bennett, et al. (2009). "miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92." <u>Genes Dev</u> 23(24): 2839-49.PMID: 20008935.
- Olson, P., J. Lu, et al. (2009). "MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer." <u>Genes Dev</u> 23(18): 2152-65.PMID: 19759263.
- Ota, A., H. Tagawa, et al. (2004). "Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma." <u>Cancer</u> <u>Res</u> 64(9): 3087-95.PMID: 15126345.
- Ozsolak, F., L. L. Poling, et al. (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." <u>Genes Dev</u> 22(22): 3172-83.PMID: 19056895.

Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." <u>Mol Cell</u> 25(5): 635-46.PMID: 17349952.

Р

- Pause, A., G. J. Belsham, et al. (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." <u>Nature</u> 371(6500): 762-7.PMID: 7935836.
- Pavitt, G. D., K. V. Ramaiah, et al. (1998). "eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange." <u>Genes Dev</u> 12(4): 514-26.PMID: 9472020.
- Peters, L. and G. Meister (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." <u>Mol</u> <u>Cell</u> 26(5): 611-23.PMID: 17560368.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." <u>Mol Cell</u> 21(4): 533-42.PMID: 16483934.
- Pickering, B. M., S. A. Mitchell, et al. (2003). "Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo." <u>Nucleic Acids Res</u> 31(2): 639-46.PMID: 12527772.
- Piecyk, M., S. Wax, et al. (2000). "TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha." <u>EMBO J</u> 19(15): 4154-63.PMID: 10921895.
- Pothof, J., N. S. Verkaik, et al. (2009). "MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response." <u>EMBO J</u> 28(14): 2090-9.PMID: 19536137.
- Poulin, F., A. C. Gingras, et al. (1998). "4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family." <u>J Biol Chem</u> 273(22): 14002-7.PMID: 9593750.
- Powley, I. R., A. Kondrashov, et al. (2009). "Translational reprogramming following UVB irradiation is mediated by DNA-PKcs and allows selective recruitment to the polysomes of mRNAs encoding DNA repair enzymes." <u>Genes Dev</u> 23(10): 1207-20.PMID: 19451221.
- Prendergast, G. C. (2001). "Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis." <u>Nat Rev Cancer</u> 1(2): 162-8.PMID: 11905808.

- Prendergast, G. C., R. Khosravi-Far, et al. (1995). "Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras." <u>Oncogene</u> 10(12): 2289-96.PMID: 7784077.
- Pullmann, R., Jr., H. H. Kim, et al. (2007). "Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs." <u>Mol Cell Biol</u> 27(18): 6265-78.PMID: 17620417.

R

- Radford, H. E., H. A. Meijer, et al. (2008). "Translational control by cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1779(4): 217-29.PMID: 18316045.
- Raineri, I., D. Wegmueller, et al. (2004). "Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in AREdependent mRNA turnover studied by RNA interference." <u>Nucleic Acids Res</u> 32(4): 1279-88.PMID: 14976220.
- Raspaglio, G., I. De Maria, et al. (2010). "HuR regulates beta-tubulin isotype expression in ovarian cancer." <u>Cancer Res</u> 70(14): 5891-900.PMID: 20587520.
- Rattenbacher, B., D. Beisang, et al. (2010). "Analysis of CUGBP1 targets identifies GUrepeat sequences that mediate rapid mRNA decay." <u>Mol Cell Biol</u> 30(16): 3970-80.PMID: 20547756.
- Rebane, A., A. Aab, et al. (2004). "Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR." <u>RNA</u> 10(4): 590-9.PMID: 15037768.
- Reiling, J. H. and D. M. Sabatini (2006). "Stress and mTORture signaling." <u>Oncogene</u> 25(48): 6373-83.PMID: 17041623.
- Reimann, I., A. Huth, et al. (2002). "Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE." J <u>Mol Biol</u> 315(5): 965-74.PMID: 11827469.

- Rinaldi, A., G. Poretti, et al. (2007). "Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma." <u>Leuk Lymphoma</u> 48(2): 410-2.PMID: 17325905.
- Rivas, F. V., N. H. Tolia, et al. (2005). "Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC." <u>Nat Struct Mol Biol</u> 12(4): 340-9.PMID: 15800637.
- Roig, J. and J. A. Traugh (1999). "p21-activated protein kinase gamma-PAK is activated by ionizing radiation and other DNA-damaging agents. Similarities and differences to alpha-PAK." J Biol Chem 274(44): 31119-22.PMID: 10531298.

## S

- Sarkar, B., J. Y. Lu, et al. (2003). "Nuclear import and export functions in the different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family." J <u>Biol Chem</u> 278(23): 20700-7.PMID: 12668672.
- Sarkar, B., Q. Xi, et al. (2003). "Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform." <u>Mol Cell Biol</u> 23(18): 6685-93.PMID: 12944492.
- Sasaki, T., A. Shiohama, et al. (2003). "Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled." <u>Genomics</u> 82(3): 323-30.PMID: 12906857.
- Sato, N., T. Fukui, et al. (2007). "RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line." Int J Cancer 120(3): 543-51.PMID: 17096327.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." <u>Cell</u> 115(2): 199-208.PMID: 14567917.
- Sela-Brown, A., J. Silver, et al. (2000). "Identification of AUF1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability." <u>J Biol Chem</u> 275(10): 7424-9.PMID: 10702317.

- Selbach, M., B. Schwanhausser, et al. (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." <u>Nature</u> 455(7209): 58-63.PMID: 18668040.
- Shanmugam, N., M. A. Reddy, et al. (2008). "Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products." <u>J Biol Chem</u> 283(52): 36221-33.PMID: 18854308.
- Sharma, N., S. A. Ogram, et al. (2009). "Functional role of the 5' terminal cloverleaf in Coxsackievirus RNA replication." <u>Virology</u> 393(2): 238-49.PMID: 19732932.
- Shaw, G. and R. Kamen (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." <u>Cell</u> 46(5): 659-67.PMID: 3488815.
- Sheikh, M. S. and A. J. Fornace, Jr. (1999). "Regulation of translation initiation following stress." <u>Oncogene</u> 18(45): 6121-8.PMID: 10557103.
- Shukla, S., W. P. Dirksen, et al. (2004). "TIA proteins are necessary but not sufficient for the tissue-specific splicing of the myosin phosphatase targeting subunit 1." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 279(14): 13668-76.PMID: 14736875.
- Skuli, N., S. Monferran, et al. (2006). "Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxiainducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells." <u>Cancer Res</u> 66(1): 482-9.PMID: 16397264.
- Song, I. S., S. Tatebe, et al. (2005). "Delayed mechanism for induction of gammaglutamylcysteine synthetase heavy subunit mRNA stability by oxidative stress involving p38 mitogen-activated protein kinase signaling." <u>J Biol Chem</u> 280(31): 28230-40.PMID: 15946948.
- Sparanese, D. and C. H. Lee (2007). "CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease." <u>Nucleic Acids Res</u> 35(4): 1209-21.PMID: 17264115.

- Spriggs, K. A., M. Stoneley, et al. (2008). "Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate." <u>Biol Cell</u> 100(1): 27-38.PMID: 18072942.
- Stoecklin, G., M. Colombi, et al. (2002). "Functional cloning of BRF1, a regulator of AREdependent mRNA turnover." <u>EMBO I</u> 21(17): 4709-18.PMID: 12198173.
- Stoecklin, G., T. Mayo, et al. (2006). "ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway." <u>EMBO Rep</u> 7(1): 72-7.PMID: 16299471.
- Stoecklin, G., S. A. Tenenbaum, et al. (2008). "Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin." <u>J Biol Chem</u> 283(17): 11689-99.PMID: 18256032.
- Stoneley, M. and A. E. Willis (2004). "Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression." <u>Oncogene</u> 23(18): 3200-7.PMID: 15094769.
- Sudhakar, A., A. Ramachandran, et al. (2000). "Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B." <u>Biochemistry</u> 39(42): 12929-38.PMID: 11041858.
- Sun, G., H. Li, et al. (2010). "Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR." <u>Nucleic Acids Res</u> 38(1): 239-52.PMID: 19850724.
- Sureban, S. M., N. Murmu, et al. (2007). "Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation." <u>Gastroenterology</u> 132(3): 1055-65.PMID: 17383427.

## Т

Taylor, G. A., E. Carballo, et al. (1996). "A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency." <u>Immunity</u> 4(5): 445-54.PMID: 8630730.

- Tian, Q., M. Streuli, et al. (1991). "A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells." <u>Cell</u> 67(3): 629-39.PMID: 1934064.
- Timchenko, L. T., J. W. Miller, et al. (1996). "Identification of a (CUG)n triplet repeat RNAbinding protein and its expression in myotonic dystrophy." <u>Nucleic Acids Res</u> 24(22): 4407-14.PMID: 8948631.
- Timchenko, N. A., P. Iakova, et al. (2001). "Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy." <u>Mol Cell Biol</u> 21(20): 6927-38.PMID: 11564876.
- Timchenko, N. A., G. L. Wang, et al. (2005). "RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2." <u>J Biol Chem</u> 280(21): 20549-57.PMID: 15788409.
- Timchenko, N. A., A. L. Welm, et al. (1999). "CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms." <u>Nucleic Acids Res</u> 27(22): 4517-25.PMID: 10536163.
- Tovar, D., J. C. Faye, et al. (2003). "Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity." <u>Genomics</u> 81(5): 525-30.PMID: 12706111.
- Trabucchi, M., P. Briata, et al. (2009). "The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs." <u>Nature</u>.PMID: 19458619.
- Tsuda, K., K. Kuwasako, et al. (2009). "Structural basis for the sequence-specific RNArecognition mechanism of human CUG-BP1 RRM3." <u>Nucleic Acids Res</u> 37(15): 5151-66.PMID: 19553194.

U - V

- Ungureanu, N. H., M. Cloutier, et al. (2006). "Internal ribosome entry site-mediated translation of Apaf-1, but not XIAP, is regulated during UV-induced cell death." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 281(22): 15155-63.PMID: 16595687.
- van der Houven van Oordt, W., M. T. Diaz-Meco, et al. (2000). "The MKK(3/6)-p38signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation." <u>I Cell Biol</u> 149(2): 307-16.PMID: 10769024.
- van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2007). "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA." <u>Science</u> 316(5824): 575-9.PMID: 17379774.
- Vardouli, L., E. Vasilaki, et al. (2008). "A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases." <u>FEBS J</u> 275(16): 4074-87.PMID: 18631173.
- Vasilaki, E., E. Papadimitriou, et al. (2010). "Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways." <u>FASEB J</u> 24(3): 891-905.PMID: 19890017.
- Vasudevan, S. and J. A. Steitz (2007). "AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2." <u>Cell</u> 128(6): 1105-18.PMID: 17382880.
- Vasudevan, S., Y. Tong, et al. (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." <u>Science</u> 318(5858): 1931-4.PMID: 18048652.
- Vattem, K. M. and R. C. Wek (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(31): 11269-74.PMID: 15277680.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." <u>Science</u> 291(5507): 1304-51.PMID: 11181995.
- Vlasova, I. A., N. M. Tahoe, et al. (2008). "Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1." <u>Mol Cell</u> 29(2): 263-70.PMID: 18243120.

von Roretz, C. and I. E. Gallouzi (2008). "Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation?" <u>J Cell Biol</u> 181(2): 189-94.PMID: 18411313.

## W

- Wagner, B. J., C. T. DeMaria, et al. (1998). "Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms." <u>Genomics</u> 48(2): 195-202.PMID: 9521873.
- Wang, D. A. and S. M. Sebti (2005). "Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities." <u>J Biol Chem</u> 280(19): 19243-9.PMID: 15713677.
- Wang, J., W. Zhao, et al. (2009). "The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis." <u>Oncology</u> 76(6): 420-9.PMID: 19420963.
- Wang, S., Y. Yan-Neale, et al. (2003). "Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line." <u>Oncogene</u> 22(40): 6204-13.PMID: 13679859.
- Wang, W., H. Furneaux, et al. (2000). "HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light." <u>Mol Cell Biol</u> 20(3): 760-9.PMID: 10629032.
- Wang, W., X. Yang, et al. (2004). "AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1: involvement in the nuclear import of RNAbinding protein HuR." <u>I Biol Chem</u> 279(46): 48376-88.PMID: 15342649.
- Weinmann, L., J. Hock, et al. (2009). "Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs." <u>Cell</u> 136(3): 496-507.PMID: 19167051.
- Westmark, C. J., V. B. Bartleson, et al. (2005). "RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light." <u>Oncogene</u> 24(3): 502-11.PMID: 15543229.
- Wheeler, A. P. and A. J. Ridley (2004). "Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility." <u>Exp Cell Res</u> 301(1): 43-9.PMID: 15501444.

- Wherlock, M., A. Gampel, et al. (2004). "Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase." <u>J Cell Sci</u> 117(Pt 15): 3221-31.PMID: 15226397.
- Wilson, G. M., Y. Sun, et al. (1999). "Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region." <u>Mol Cell Biol</u> 19(6): 4056-64.PMID: 10330146.
- Winter, J., S. Jung, et al. (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." <u>Nat Cell Biol</u> 11(3): 228-34.PMID: 19255566.
- Wu, L., J. Fan, et al. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> 103(11): 4034-9.PMID: 16495412.
- Wu, S., Y. Hu, et al. (2002). "Ultraviolet light inhibits translation through activation of the unfolded protein response kinase PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum." J <u>Biol Chem</u> 277(20): 18077-83.PMID: 11877419.

X - Y - Z

- Xu, F., X. Zhang, et al. (2010). "Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma." <u>J Cell</u> <u>Biochem</u>.PMID: 20626035.
- Xu, N., C. Y. Chen, et al. (2001). "Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover." <u>Mol Cell Biol</u> 21(20): 6960-71.PMID: 11564879.
- Yamasaki, S. and P. Anderson (2008). "Reprogramming mRNA translation during stress." <u>Curr Opin Cell Biol</u> 20(2): 222-6.PMID: 18356035.
- Yang, C. and F. Carrier (2001). "The UV-inducible RNA-binding protein A18 (A18 hnRNP) plays a protective role in the genotoxic stress response." <u>J Biol Chem</u> 276(50): 47277-84.PMID: 11574538.

- Yang, R., D. J. Weber, et al. (2006). "Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleoprotein A18." <u>Nucleic Acids Res</u> 34(4): 1224-36.PMID: 16513844.
- Yoo, P. S., C. A. Sullivan, et al. (2009). "Tissue microarray analysis of 560 patients with colorectal adenocarcinoma: high expression of HuR predicts poor survival." <u>Ann Surg</u> <u>Oncol</u> 16(1): 200-7.PMID: 19009247.
- Yu, Q., S. J. Cok, et al. (2003). "Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR)." <u>J Biol Chem</u> 278(3): 1579-84.PMID: 12426321.
- Zeng, P. Y., N. Rane, et al. (2003). "Role for RhoB and PRK in the suppression of epithelial cell transformation by farnesyltransferase inhibitors." <u>Oncogene</u> 22(8): 1124-34.PMID: 12606940.
- Zhang, W., B. J. Wagner, et al. (1993). "Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1." <u>Mol Cell Biol</u> 13(12): 7652-65.PMID: 8246982.
- Zhou, J., Y. Zhu, et al. (2010). "A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression." <u>Int J</u> <u>Cancer</u>.PMID: 20473933.
- Zou, T., L. Liu, et al. (2008). "Polyamines modulate the subcellular localization of RNAbinding protein HuR through AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1." <u>Biochem J</u> 409(2): 389-98.PMID: 17919121.