

Université de Sherbrooke

Étude des mécanismes de régulation de l'épissage alternatif

**Par
Hervé Vennin Rendos**

Programme de microbiologie

**Mémoire présenté à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie**

Sherbrooke, Québec, Canada

Déposée en mai 2020

Membres du jury d'évaluation

Benoît Chabot, Ph. D

Antonio Conconi, Ph. D (membre interne)

Michelle Scott, Ph. D (membre externe)

*Je dédie ce mémoire
à tous ceux qui se relèvent et qui luttent pour réussir
et à tous ceux qui les soutiennent*

*« Mais quand on est jeune, on doit voir du pays, acquérir de l'expérience, des idées,
élargir son intelligence... »*

Joseph Conrad

Résumé

Étude des mécanismes de régulation de l'épissage alternatif

Par Hervé Vennin Rendos
Programme de microbiologie

L'épissage alternatif est un processus finement régulé qui permet de générer une grande variété d'ARNm. Il est l'une des sources de la diversité du protéome. Il permet ainsi de produire, à partir d'un nombre limité de gènes, une multitude de protéines avec des fonctions différentes et même antagonistes. De plus, il a un rôle dans des processus cellulaires importants tels que l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la migration et la survie dans des conditions de stress. Les conséquences de la dérégulation de l'épissage alternatif sont critiques et peuvent entraîner des défauts reliés à de nombreuses maladies comme le cancer. De plus, ces perturbations vont souvent toucher l'épissage alternatif des gènes apoptotiques. Au vu de son rôle crucial dans le processus de l'apoptose, le gène *Bcl-x* a été l'objet d'une grande attention depuis de nombreuses années. Ce gène donne deux variants pro- et anti-apoptotique: *Bcl-xS* et *Bcl-xL*. Dans notre laboratoire, l'étude de *Bcl-x* a permis d'entrevoir les mécanismes par lesquels le choix entre les deux isoformes est déterminé et de découvrir plusieurs facteurs et éléments d'épissage impliqués.

Dans ce travail, nous avons poursuivi ces recherches avec trois approches pour tenter d'approfondir les connaissances sur l'épissage alternatif. Dans une première partie, l'idée a été de comprendre la mécanique combinatoire entre des facteurs d'épissage dans la régulation d'un site en partant de l'exemple de *Bcl-x*. Ainsi les séquences de liaison de 4 protéines (RNPS1, eIF4A3, hnRNP K et hnRNP F/H) ont été insérées autour d'un site d'épissage dans un minigène pour ensuite effectuer des essais d'épissages *in vitro* et *in vivo*. L'objectif est ainsi de pouvoir créer une base de données indiquant pour une combinaison de protéine l'impact sur l'épissage. Nous avons observé que ce système fonctionne puisque les insertions modulent l'épissage mais que les changements diffèrent selon l'essai. De plus, les résultats obtenus ne correspondent pas à ceux observés avec *Bcl-x*, indiquant ainsi que le modèle proposé a ses limites et qu'il reste à améliorer. Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'impact de deux drogues (oxaliplatine et staurosporine) sur 57 événements d'épissage alternatif dans les trois lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC. Le but étant d'étudier à quels niveaux ces drogues affectent l'épissage et de voir si les effets différents observés avec les drogues entre lignée cellulaire pour *Bcl-x* pouvaient se retrouver pour d'autres événements et avec d'autres lignées. À la suite du traitement à la staurosporine, aucun événement en commun n'a été identifié entre les trois lignées. Avec l'oxaliplatine, nous avons isolé quatre événements d'épissage modulés, soit *Bcl-x*, *AURKA*, *INCENP* et *PPP3CB*. Ces derniers sont affectés de la même manière entre les lignées mais avec des amplitudes différentes. Aussi, *INCENP* a été le seul affecté presque partout, sauf dans les cellules HIEC traitées à la staurosporine. Finalement, dans une dernière partie, nous nous sommes penchés sur les relations entre l'épissage alternatif des 57 événements précédents et la chromatine. Nous avons testé 14 composés affectant l'état de la chromatine en traitant ou non avec l'oxaliplatine. L'hypothèse a été que ces composés pouvaient affecter les événements et modifier l'effet de l'oxaliplatine permettant ainsi d'améliorer notre connaissance sur son action. Aucun effet important n'a été observé avec les composés utilisés seuls. En revanche, avec l'oxaliplatine, certains composés augmentent son effet sur l'épissage (JQ1 et BAY-850) et d'autres le diminuent (GSK8814, BAZ2 et SGCBP30).

À terme, ce projet contribue à l'ensemble de travaux ayant pour but d'améliorer les traitements anti-cancéreux en tentant de les rendre plus spécifiques. En effet, grâce à une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans chaque cancer, il sera possible de mieux les cibler.

Mots-clefs : épissage alternatif, *Bcl-x*, protéines de liaison à l'ARN, mécanique combinatoire, oxaliplatine, staurosporine, chromatine

Table des matières

Résumé	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
L'épissage.....	1
Le mécanisme d'épissage.....	2
L'épissage alternatif.....	7
Les événements d'épissage alternatif.....	7
La régulation de l'épissage alternatif.....	8
La force des sites.....	9
Les régions régulatrices.....	9
Les protéines SR et les protéines hnRNP.....	10
Les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif.....	12
La définition de l'exon et de l'intron.....	12
Le recrutement direct du spliceosome.....	13
Les modifications post-traductionnelles.....	13
La signalisation.....	14
Épissage co-transcriptionnel.....	14
Le remodelage de la chromatine.....	15
Le contexte cellulaire.....	16
Structure secondaire des pré-ARNm.....	17
L'épissage alternatif et le cancer.....	17
Apoptose.....	18
Le gène <i>Bcl-x</i>	21
Les régulations de <i>Bcl-x</i>	22
Matériel et méthodes.....	29
Culture et extraction cellulaire.....	29
Constructions des plasmides.....	29

Transcription tiède <i>in vitro</i>	30
Épissage <i>in vitro</i>	31
Extraction d'ARN total	31
Épissage <i>in vivo</i>	31
Détection des produits d'épissage par RT- PCR.....	32
Résultats.....	34
Partie 1: Explorer la mécanique combinatoire d'éléments régulateurs de l'épissage alternatif de <i>Bcl-x</i>	34
Essais <i>in vitro</i>	36
Essais <i>in vivo</i>	39
Partie 2: Différences d'épissage entre les lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC en réponse aux dommages à l'ADN et à l'inhibition de la voie de signalisation PKC	41
Comparaison de l'effet de l'oxaliplatine et de la staurosporine sur les événements d'épissage dans la lignée cellulaire HEK293	41
Comparaison de l'effet de l'oxaliplatine et de la staurosporine sur des événements d'épissage dans les lignées cellulaires HCT116 et HIEC	42
Partie 3: Remodelage de la chromatine et épissage alternatif.....	50
Discussion.....	55
Partie 1: Explorer la mécanique combinatoire d'éléments régulateurs de l'épissage alternatif de <i>Bcl-x</i>	55
Partie 2: Différences d'épissage entre les lignées cellulaires HEK293 et HCT116 en réponse aux dommages à l'ADN.....	59
Partie 3: Remodelage de la chromatine et épissage alternatif.....	62
Remerciements.....	64
Liste des références.....	65
Annexes.....	74

Liste des figures

Figure 1	Étapes de l'épissage alternatif réalisées par le spliceosome.	4
Figure 2	Séquences consensus pour les sites d'épissage 5' et 3' et le site de branchement.	5
Figure 3	Réactions de transestérification.	6
Figure 4	Types d'événement d'épissage alternatif chez l'humain.	8
Figure 5	Les éléments régulateurs d'épissage agissant en cis.	10
Figure 6	Les marques sur les queues des histones.....	16
Figure 7	Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.	19
Figure 8	Schéma représentant les facteurs apoptotiques régulés par l'épissage alternatif.....	20
Figure 9	Épissage alternatif de Bcl-x.....	22
Figure 10	Le contrôle de l'épissage de Bcl-x.	23
Figure 11	Changement des régulations du pré-ARNm après un stress de dommages à l'ADN. ...	24
Figure 12	Liens entre les réponses aux dommages à l'ADN et l'épissage alternatif.	26
Figure 13	L'ARN pré-messager modèle 77BAd utilisé dans les tests in vivo et in vitro afin d'étudier l'impact des éléments insérés.	35
Figure 14	Épissage alternatif in vitro des constructions 77BAd contenant les différents éléments reconnus par eIF4A3, RNPS1, hnRNP K et hnRNP F/H.	38
Figure 15	Épissage alternatif in vivo des constructions 77BAd contenant les différents éléments reconnus par eIF4A3, RNPS1, hnRNP K et hnRNP F/H.	39
Figure 16	Diagramme de Venn montrant les événements d'épissage réagissant à l'oxaliplatine et/ou à la staurosporine dans la lignée cellulaire HEK293.	42
Figure 17	Épissages alternatifs de Bcl-x in vivo dans les lignées cellulaires HCT116 et HIEC traitées à l'oxaliplatine ou à la staurosporine.....	43
Figure 18	Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage différentiels en réponse à l'oxaliplatine et/ou à la staurosporine dans les lignées cellulaires HCT116 et HIEC.	44
Figure 19	Diagramme de Venn montrant les événements d'épissage différentiels en réponse à l'oxaliplatine dans les lignées cellulaires HEK293, HIEC et HCT116.	45
Figure 20	Impact de l'oxaliplatine sur des événements d'épissage dans les trois lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC.	46

Figure 21	Diagramme de Venn montrant les événements d'épissage différentiel en réponse à la staurosporine dans les lignées cellulaires HEK293, HIEC et HCT116.	47
Figure 22	Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage communs en réponse à l'oxaliplatine ou à la staurosporine entre les lignées cellulaires HEK293 et HIEC.	48
Figure 23	Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage communs en réponse à l'oxaliplatine ou à la staurosporine entre les lignées cellulaires HCT116 et HIEC.	49
Figure 24	Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage communs en réponse à l'oxaliplatine ou à la staurosporine entre les lignées cellulaires HCT116 et HEK293....	50
Figure 25	Épissage alternatif de Bcl-x in vivo dans la lignée cellulaire HEK293 après un traitement à l'oxaliplatine ou avec le composé BI-9564.	51
Figure 26	Effet des composés GSK8814, BAZ2-ICR et SGCCBP30 sur les événements d'épissage des gènes KIF13A et CASP9.	52
Figure 27	Effet des composés JQ1 et BAY-850 sur les événements d'épissage des gènes KITLG, ZWINT et TSSC4.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1	Listes des protéines SR.....	11
Tableau 2	Récapitulatif des effets préliminaires observées des facteurs d'épissage sur le site d'épissage xS sur le gène <i>Bcl-x</i> et sur le site d'épissage 5' proximal du minigène 77BAD.....	57
Tableau supplémentaire S1	Événements d'épissage alternatif affectés par l'oxaliplatin et la staurosporine dans les lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC..	74
Tableau supplémentaire S2	Événements d'épissage alternatif affectés par l'oxaliplatin et les composés dans la lignée cellulaire HEK293.	79

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Apaf-1	Apoptotic peptidase-activating factor 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASAP	Apoptosis and splicing associated proteins
ASE	Événements d'épissage alternatif
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BH	Domaine d'homologie à la protéine Bcl-2
bp	Paire de bases
CRCE1	Ceramide-responsive RNA cis-element 1 et 2
CTD	Domaine C-terminal de l'ARN polymérase II
DDR	DNA damage response / Voie de réponse aux dommages à l'ADN
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule
EJC	Exon Junction Complex / Complexe de jonction d'exons
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
FADD	FAS-associated death domain
FBS	Sérum foetal bovin
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
ISE	Intronic splicing enhancer
ISS	Intronic splicing silencer
kb	Kilobase
KH	hnRNP K homology / Homologie à hnRNP K

MOMP	Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay / Dégradation des ARN messenger non-sens
nt	Nucléotide
PBS	Phosphate buffered saline / Tampon phosphate salin
pol	Polymérase
PP1 et PP2A	Phosphatase de protéines 1 et 2A
pré-ARNm	ARNm précurseur
PTB	Polypyrimidine tract binding
RBD	RNA-binding domain / Domaine de liaison à l'ARN
RBM	RNA binding motif protein
RBP	RNA-binding protein / Protéine liant l'ARN
PTC	Premature termination codon / Codon prématuré de terminaison
RBP	RNA binding protein / Protéine de liaison à l'ARN
RNPS1	RNA-binding protein with serine-rich domain 1
RRM	RNA recognition motif / Motif de reconnaissance de l'ARN
RT-PCR	Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction
Sam68	Src Associated in Mitosis of 68 kDa
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein / Petite ribonucléoprotéine nucléaire
SR	Serine/arginine rich / Riche en sérine/arginine
SRE	Splicing regulatory element / Éléments régulateurs d'épissage
SRSF	SR splicing factor / Facteur d'épissage SR
ss	<i>splicing sites</i> / site d'épissage.
TCERG1	Transcription elongation regulator 1
TRADD	TNFR-associated death domain
U2AF	U2 auxiliary factor / Facteur auxiliaire de U2
UTR	Untranslated region / Région non-traduite

Introduction

L'humain, la souris et le nématode sont des animaux eucaryotes possédant des niveaux de complexité très différents mais qui pourtant possèdent environ 20 000 gènes codant pour des protéines (Pray et al., 2008; Koralewski et Krutovsky, 2011; Auton et al., 2015). Par ailleurs, il existe d'autres organismes eucaryotes qui ont plus de gènes tels que le poisson-zèbre et le blé avec respectivement 26 000 et 95 000 gènes. De ce fait, le nombre de gènes ne corrèle pas avec la complexité de l'organisme. D'autres éléments dans la cellule jouent un rôle plus important comme les protéines. Ainsi, chez l'humain, il est estimé qu'il y a potentiellement jusqu'à 200 000 protéines différentes produites (Zhiqiang et al., 2015).

Les organismes ont donc des moyens pour générer de la diversité protéique, qui est un élément fondamental dans leur complexité et dans leur évolution. En effet, cette diversité a permis l'adaptation à différents environnements et leur développement permettant la régulation précise de mécanismes cellulaires de survie dans des conditions de stress.

Pour créer cette diversité protéique, nous pouvons ainsi évoquer le processus de duplication des gènes (Iniguez et Hernandez, 2017) et celui d'épissage alternatif, qui va nous intéresser dans cette étude. Ce dernier va permettre de produire plusieurs ARN messager (ARNm) à partir d'un unique pré-ARN messager (pré-ARNm). Ainsi un unique gène pourra ultimement engendrer plusieurs protéines qui peuvent avoir des rôles antagonistes (Nilsen et Graveley, 2010). L'épissage a lieu au cours des stades du développement, sous de multiples stress et dans différents types cellulaires (Li et al., 2016). L'épissage alternatif a donc un rôle fondamental. En effet, des modifications, tel que des ajouts de séquences, dans l'ARNm mature peuvent affecter le cadre de lecture lors de la traduction, induisant potentiellement des protéines avec des domaines supplémentaires ou absents qui peuvent interférer avec son activité, sa localisation et sa stabilité (Remy et al., 2013 ; Kalyna et al., 2012; Zhiguo et al., 2013).

L'épissage

Il y a plus de 40 ans, ce mécanisme de réarrangement a été observé pour la première fois en étudiant, par microscopie électronique, l'ARNm de l'adénovirus humain de type 2. Un phénomène

de formation de plusieurs ARNm plus courts à partir d'un unique long ARN précurseur fût mis en évidence (Chow et al., 1977).

Chez l'humain, après la transcription par l'ARN polymérase II, les pré-ARNm sont discontinus. En effet, deux types de régions vont se distinguer selon si elles sont conservées (exon) ou non (intron) dans l'ARNm mature. À la suite du processus d'épissage, les introns vont être excisés et les exons, qui contiennent des régions non traduites (UTR), vont rester. Dans le cas des gènes qui codent pour des protéines, les séquences exoniques, inclus entre les UTR, seront traduites. D'autres types d'ARN peuvent être épissés mais seront non codants, tels que les ARN ribosomiques ou les ARN de transferts.

À la différence de l'épissage constitutif où tous les exons sont joints après l'excision des introns pour ne former qu'un seul ARNm mature, dans l'épissage alternatif, certains exons, introns ou une partie d'entre eux peuvent être inclus ou non dans le transcrit final. En effet, selon le tissu et les conditions cellulaires, des fragments exoniques peuvent devenir introniques, et inversement. Chez l'humain, 95% des gènes multi-exoniques sont épissés alternativement (Pan et al., 2008).

Le mécanisme d'épissage

L'épissage est réalisé par le spliceosome. Ce large complexe est composé de plus de 150 protéines et de 5 petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP): U1, U2, U4/U6 et U5. Ces dernières contiennent plusieurs protéines et un ARN de 100 à 300 nucléotides qui va reconnaître des séquences caractéristiques aux sites d'épissage. La composition du spliceosome va évoluer au fur et à mesure des snRNP nécessaires à son activité et cela de manière ATP-dépendante (**Fig. 1**). Quatre complexes vont ainsi se former et se succéder : E, A, B et C (Matera et Wang, 2014). Il est à noter que d'autres facteurs interviennent également comme l'hétérodimère U2AF (U2 auxiliary factor) qui aide la sous-unité BBP (SF1).

La première étape consiste en la formation du complexe E: d'une part, avec la liaison de la snRNP U1 au site d'épissage 5' et, d'autre part, avec la liaison de U2AF sur la séquence riche en pyrimidine au site d'épissage 3'. Ceci aide à la stabilisation de l'interaction entre BBP et le site de branchement. Ensuite, la snRNP U2 se lie au point de branchement, aidé par U2AF, et déplace BBP, formant ainsi le complexe A. Cette étape va permettre de placer l'adénosine (A) en position pour attaquer le site d'épissage 5' durant la première réaction de transestérification. Durant l'étape

suivante, le complexe A se réarrange pour rapprocher les sites d'épissage. Pour cela, il s'associe avec le tri-snRNP U4/U6 et U5 formant alors le complexe B. Pour terminer l'assemblage, la snRNP U1 quitte le complexe et laisse la place à snRNP U6, dissocié du snRNP U4, qui va interagir avec la snRNP U2 au site d'épissage 5'. Le complexe C mature et actif est ainsi formé. La dernière étape est le largage de l'ARNm mature et des snRNP, qui sont rapidement recyclés après la dégradation du lariat avec qui ils restaient liés (Valadkhan et al., 2009).

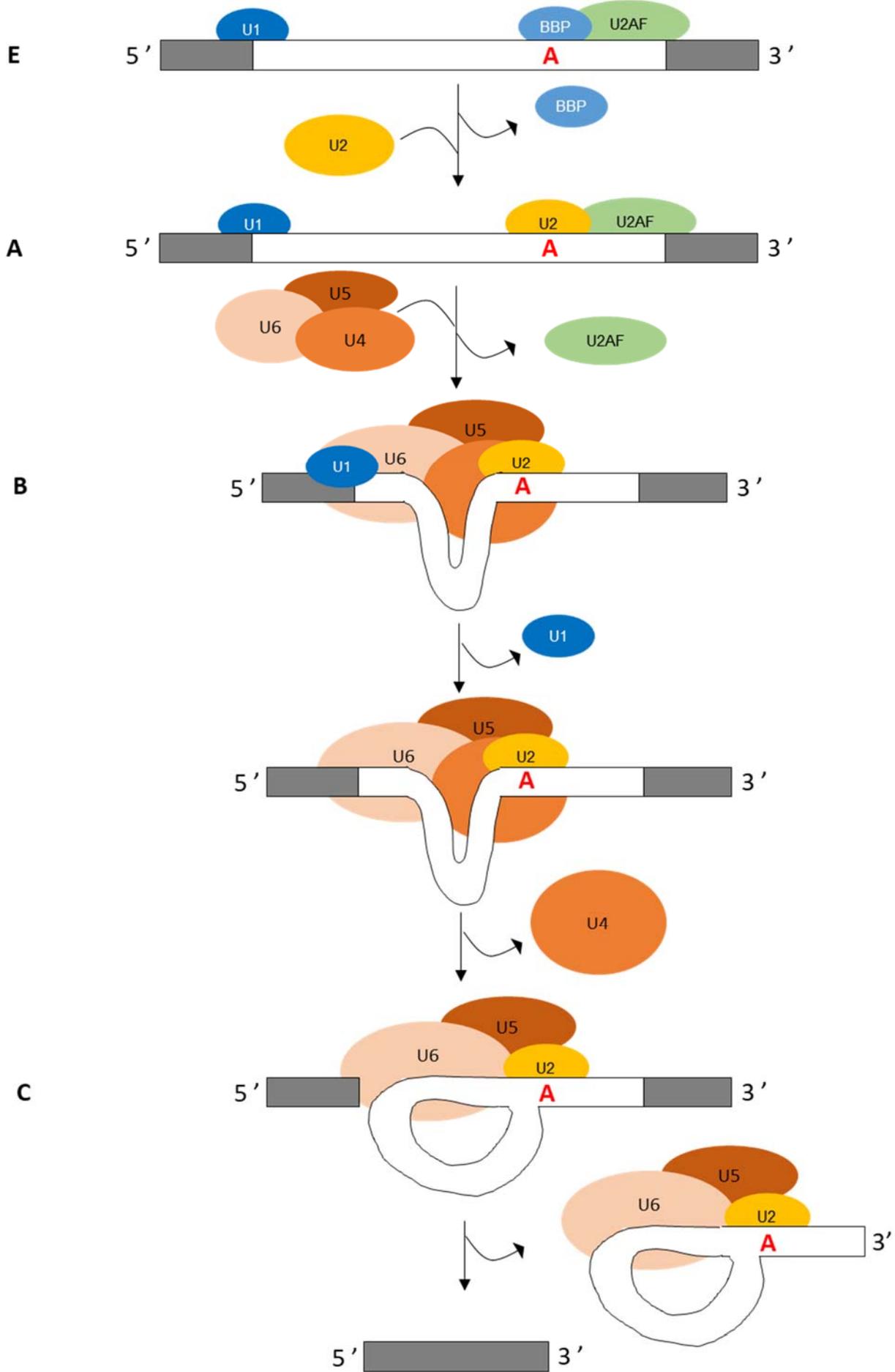


Figure 1: Étapes de l'épissage réalisées par le spliceosome. Les différents composants de la machinerie d'épissage arrivent et partent à chaque étape engendrant les modifications structurelles nécessaires à la réaction d'épissage. Les lettres désignant le nom des complexes sont indiquées à gauche. Le complexe E indique l'étape d'engagement avec la reconnaissance des sites d'épissage par la snRNP U1 et l'hétérodimère U2AF. Le complexe A représente l'arrivée de la snRNP U2. Le complexe B indique la liaison avec les snRNP U4/U6 et U5 et le largage de U2AF. Le départ de la snRNP U1 et de la snRNP U4 permet la liaison de la snRNP U6 au site d'épissage 5'. Pour finir, la snRNP U6 s'associe avec la snRNP U2 permettant d'obtenir le complexe mature et actif C.

Pour être reconnus, les extrémités des exons et des introns des pré-ARNm sont flanquées par des séquences nucléotidiques hautement conservées. Elles permettent de distinguer les introns et les exons et de déterminer le site où se produit l'épissage alternatif (**Fig. 2**). Ces séquences hautement conservées sont situées dans l'intron permettant possiblement de ne pas encombrer les séquences de l'exon. Il y a ainsi, à l'extrémité 5' d'un intron, le site 5' d'épissage, avec les nucléotides GU, et à l'extrémité 3' de l'intron, le site 3' d'épissage avec les nucléotides AG. Entre ces deux sites se trouve le site de branchement, avec une adénosine (A) conservée, suivie par une séquence riche en pyrimidines (Ritchie et al., 2009).

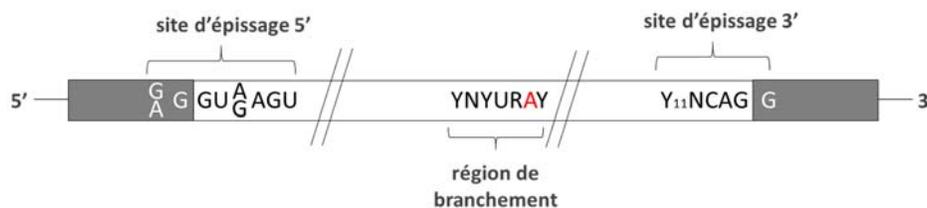


Figure 2: Séquences consensus chez l'humain pour les sites d'épissage 5' et 3' et le site de branchement avec le A (rouge) conservé. Les exons et les introns sont représentés en gris et blanc respectivement. Le site d'épissage 3' contient la séquence riche en pyrimidines (Y).

Pour que l'intron soit retiré, deux transestérifications successives se produisent. Les ponts phosphodiester sont coupés et d'autres sont reformés. La première réaction est déclenchée par le 2'OH sur le A au site de branchement qui va attaquer le G au site 5' d'épissage. Après cette première réaction, le lien entre le sucre et le phosphate au site 5' d'épissage est coupé et le 5' de

l'intron s'attache au A dans le site de branchement. La deuxième réaction implique le 3'OH libéré de l'exon du site d'épissage 5' qui attaque le groupe phosphate du site 3' d'épissage. Cela entraîne alors l'épissage entre les deux exons et la libération de l'intron. Ce morceau éliminé provient du lien entre l'extrémité 5' de l'intron avec le site de branchement A et a la forme caractéristique de lariat (Ritchie et al., 2009) (**Fig. 3**). Pour ces réactions chimiques, aucun besoin énergétique n'est nécessaire.

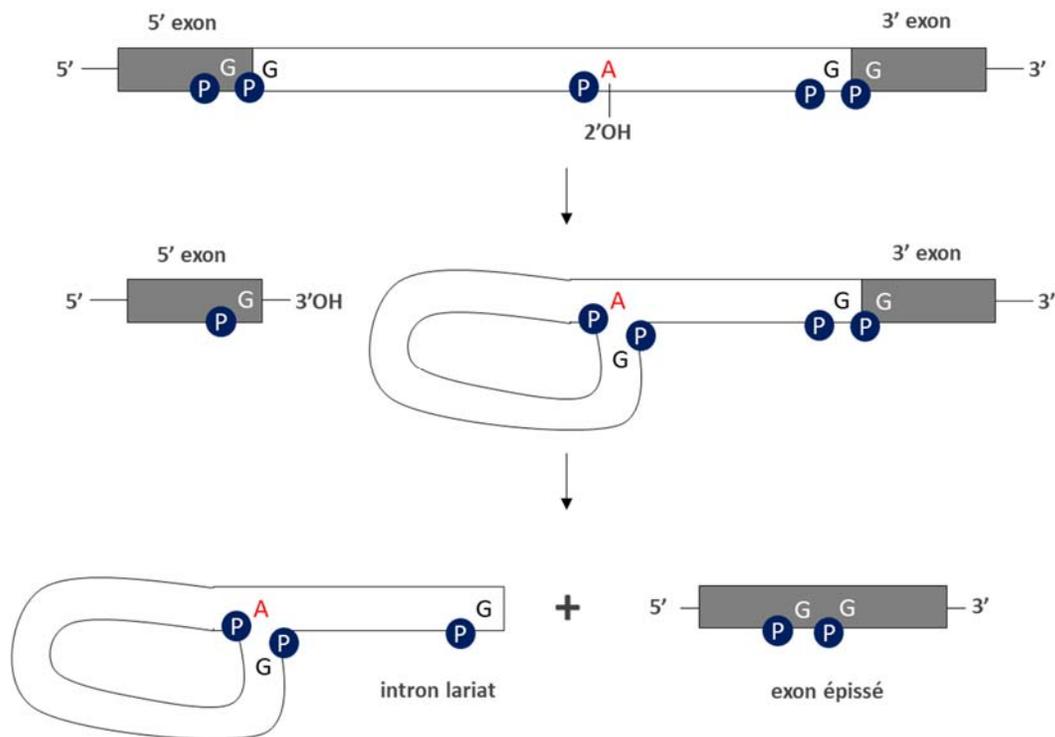


Figure 3: Réactions de transtérification. Les deux réactions mènent à la formation de la jonction entre les deux exons et d'un lariat contenant l'intron excisé, après l'attaque du groupe 2'OH de l'adénosine (A en rouge) sur le premier nucléotide intronique du site d'épissage 5'. Les exons et les introns sont représentés en gris et blanc respectivement. Les phosphates sont en bleu.

L'épissage alternatif

Les gènes contiennent un nombre d'introns qui peut varier entre un, pour la majorité des gènes de la levure, jusqu'à 363 dans le cas du gène humain *Titin*, qui contient également le plus long exon (17 106 bp) (Bang et al., 2001). La moyenne d'introns par gène augmente entre les eucaryotes unicellulaires, comme la levure, jusqu'à des organismes supérieurs tels que la drosophile et l'humain. Les introns sont souvent beaucoup plus longs que les exons qu'ils séparent. En général, les introns ont une taille de 150 nt et peuvent atteindre jusqu'à 800 kb. Un gène humain contient environ 8 exons (Lander et al., 2001) pour en moyenne une longueur de 27 000 nucléotides (Koralewski et Krutovsky, 2011). À la suite de l'épissage alternatif, il est estimé que 95 % des pré-ARNm multi-exoniques humains vont donner entre 7-12 variants (Pan et al., 2008; Djebali et al., 2012). Chez la drosophile, le gène *DSCAM*, codant pour un récepteur axonal, est un cas extrême puisque son pré-ARNm génère plus de 38 000 isoformes (Schmucker et al., 2000).

Les événements d'épissage alternatif

Selon la structure des pré-ARNm, il existe sept différents types d'événements d'épissage alternatif (Black, 2003) qui peuvent se retrouver dans un même pré-ARNm (**Fig. 4**). L'événement le plus fréquent est l'exon cassette où un exon central peut être retiré ou maintenu dans l'ARNm mature (Koralewski et Krutovshky, 2011). Il y a ensuite deux cas de site d'épissage en compétition (en 5' ou en 3') où une partie d'un exon sera conservée ou non selon l'utilisation du site d'épissage alternatif proximal ou distal. Le type suivant est l'exclusion mutuelle d'exons qui consiste en une situation où l'incorporation d'un exon entraîne l'exclusion automatique d'autres exons. Les cinquième et sixième type prennent place dans les régions non traduites (UTR pour *untranslated region*) des pré-ARNm où des promoteurs alternatifs et des sites de polyadénylation peuvent être utilisés. Finalement, pour le dernier type, un intron peut être retenu dans l'ARNm mature, sans compétition pour l'utilisation de site d'épissage.

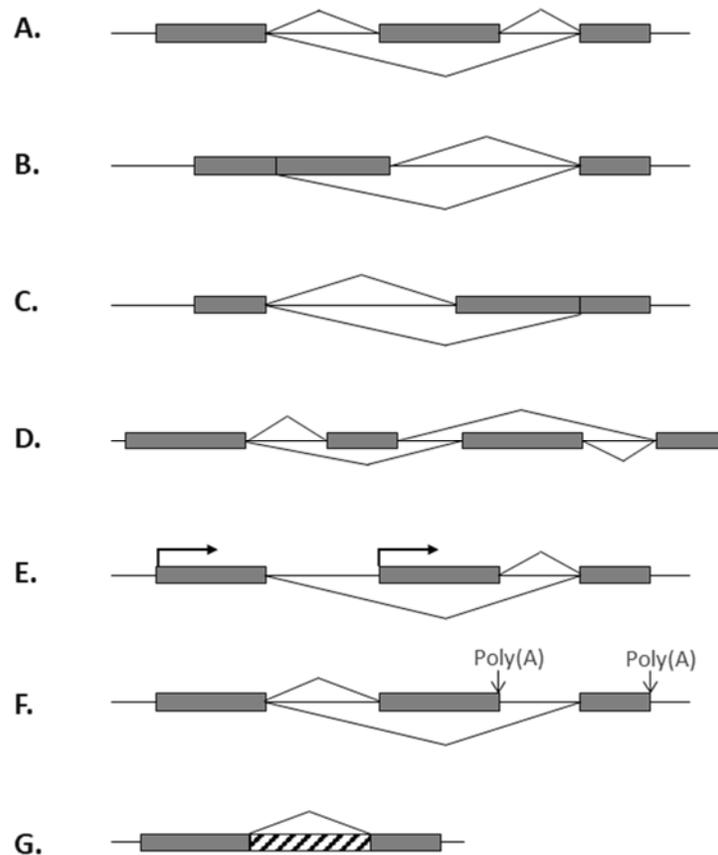


Figure 4: Types d'événement d'épissage alternatif chez l'humain. **A.** Cassette exon. **B.** Site d'épissage 5' alternatif. **C.** Site d'épissage 3' alternatif. **D.** Exons mutuellement exclusifs. **E.** Promoteurs alternatifs. **F.** Sites de polyadénylation alternatifs. **G.** Rétention d'intron.

La régulation de l'épissage alternatif

Comme vu précédemment, les exons sont petits et sont perdus parmi tous les grands introns. L'un des objectifs de recherche actuels est de comprendre comment les sites d'épissage d'exons spécifiques sont sélectionnés. Ainsi, la première chose à prendre en considération est que de nombreux éléments et processus, liés à l'ARNm, ont des rôles. Il faut donc bien les identifier pour comprendre leur impact sur la sélection et la fréquence d'utilisation des sites d'épissage par le spliceosome. Il faut aussi tenir en compte que ces éléments vont subir diverses modifications selon

le contexte cellulaire et qu'ils peuvent également interagir entre eux. Nous allons maintenant discuter de certains de ces éléments régulateurs.

La force des sites

L'une des raisons pour lesquelles l'épissage est alternatif et non constitutif provient du fait que les sites d'épissage sont dégénérés par rapport aux séquences consensus. Selon leur similitude avec ces derniers, une force des sites est déterminée. Ces sites vont ainsi avoir une affinité variable pour les facteurs d'épissage, menant à une utilisation variable par le spliceosome. Pour réduire les affinités, des régions régulatrices plus conservées sont présentes (Wang et al., 2008).

Les régions régulatrices

Tous les événements d'épissage alternatif se réalisent à la suite de l'association de régions régulatrices et d'une multitude de facteurs d'épissage. En effet, en plus des séquences hautement conservées, les introns et les exons contiennent des séquences courtes et dégénérées appelés les éléments régulateurs d'épissage (SRE pour *splicing regulatory element*). Selon leur impact sur la sélection d'un site d'épissage et leur positionnement, ces séquences sont classées en quatre catégories: les ISE et ESE activatrices (*intronic splicing enhancer* et *exonic splicing enhancer* respectivement) et les ESS et ISS inhibitrices (*exonic splicing silencer* et *intronic splicing silencer*) (Smith et Valcarcel, 2000; Black, 2003) (**Fig. 5**).

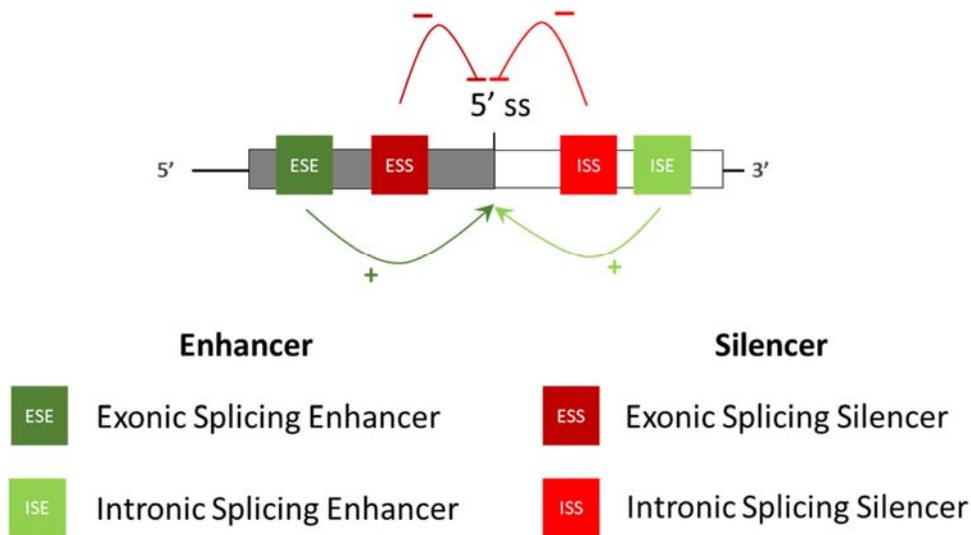


Figure 5: Les éléments régulateurs d'épissage agissant en *cis*. Les éléments favorisant l'utilisation du site d'épissage sont en vert foncé dans l'exon et en vert clair dans l'intron. Les éléments inhibant l'utilisation du site d'épissage sont en rouge foncé dans l'exon et en rouge clair dans l'intron. ss : *splicing site* / site d'épissage.

Sur les SRE, plusieurs facteurs d'épissage viennent se fixer en *trans* pour réguler finement la sélection des sites d'épissage. Ces facteurs font partie des 1500 protéines de liaison à l'ARN (ou RBP pour *RNA binding protein*) (Gerstberger et al., 2014) qui recouvrent les pré-ARNm après leur synthèse et qui vont permettre de déterminer leur devenir.

Les protéines SR et les protéines hnRNP

Parmi tous les facteurs d'épissage, deux familles ressortent majoritairement: les protéines SR et les protéines hnRNP. Au départ reconnu comme ayant des rôles spécifiques (activateur pour les protéines SR et inhibiteur pour les protéines hnRNP), il a été montré au fil des années que leurs rôles n'étaient pas aussi nets.

Les protéines SR

La première famille comprend les protéines sérines/arginines (SR) avec 12 protéines dites classiques (Howard et al., 2014) (**Tableau 1**). Celle-ci possèdent un ou deux domaines de reconnaissance à l'ARN (RRM) dans le domaine N-terminal et un domaine riche en répétition de sérines et arginines (SR). Ce domaine est important pour la localisation dans la cellule et pour interagir avec d'autres protéines, dont les composants du spliceosome (Amrein et al., 1994) et le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Das et al., 2007). Ce domaine permet ainsi la relocalisation d'un facteur d'épissage au noyau, au niveau des « speckles » nucléaires (Spector et Lamond, 2011). Pour compléter la famille, il y a également des facteurs d'épissage *SR-like* qui possèdent un domaine SR mais qui ne partagent pas l'ensemble des caractéristiques des protéines SR classiques.

nom protéine	domaines clefs
SRSF1	RRM x 2, RS
SRSF2	RRM, RS
SRSF3	RRM, RS
SRSF4	RRM x 2, RS
SRSF5	RRM x 2, RS
SRSF6	RRM x 2, RS
SRSF7	RRM, RS, CCHC-type doigt de zinc
SRSF8	RRM, RS
SRSF9	RRM x 2, RS
SRSF10	RRM x 2, RS
SRSF11	RRM, RS
SRSF12	RRM, RS

Tableau 1: Listes des protéines SR. Dans la colonne de gauche se trouve les domaines clefs: domaine de reconnaissance à l'ARN (RRM) et domaine riche en répétition de sérines et arginines (SR).

Les protéines hnRNP

La deuxième famille est représentée par les *heterogenous ribonuclear proteins* (hnRNP) avec 16 protéines canoniques (Busch et al., 2011) et plusieurs autres facteurs qui ont été ajoutés au fur et à mesure, comme TDP-43 ou Sam68 (Martinez-Contreras et al., 2007). Ces protéines possèdent une forte variabilité structurelle. Ainsi, elles ont un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN dont le plus commun est le RRM et le domaine KH (*hnRNP K homology*). N'ayant pas de domaine RS pour interagir avec d'autres protéines, elles se lient à l'aide d'un domaine auxiliaire avec les éléments régulateurs pour empêcher souvent leur utilisation.

Les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif

Ces protéines de liaison à l'ARN agissent de façons différentes via plusieurs mécanismes, tout en étant potentiellement modifiés (phosphorylation, etc.) et cela, dépendamment du type cellulaire. Ainsi, les facteurs d'épissage associés aux régions régulatrices permettent d'améliorer la reconnaissance et la sélection spécifique des sites d'épissage dans le but de recruter précisément les snRNP et de ce fait, d'assembler le spliceosome aux sites nécessaires. Nous allons revoir certains mécanismes intervenant dans la régulation.

La définition de l'exon et de l'intron

L'une des régulations cruciales a lieu durant la première étape d'assemblage du spliceosome actif pendant laquelle les interactions entre les snRNP et le pré-ARNm sont régulées par la détermination des introns et des exons. Ces régulations se déroulent principalement durant l'assemblage des complexes E et A (Black, 2003). Toutes les réactions d'épissage nécessitent en premier de déterminer les limites de l'intron pour le retirer correctement car les séquences hautement conservées à leur extrémité ne sont pas suffisantes et peuvent être très éloignées. Il faut ainsi qu'il y ait définition de l'exon et de l'intron. Toutefois, la taille des exons étant beaucoup plus petite que celle de bien des introns, c'est dans ces derniers qu'il y a le plus de séquence *cis* alors que les exons sont plus conservés. Il semble évident que les exons vont être les éléments qui vont être identifiés, permettant d'éviter l'utilisation de sites d'épissage isolés. Ainsi, la snRNP U1

et la snRNP U2 vont interagir dans le même exon pour le définir (House et al., 2006) et des facteurs d'épissage peuvent intervenir. D'une part de manière positive, avec par exemple la protéine SR SRSF2 qui renforce la stabilité entre la snRNP U1 (De Conti et al., 2013) et la snRNP U2 au site de branchement lors de la formation du complexe A (Fu et Maniatis, 1992). D'autre part, les facteurs peuvent inhiber la formation du complexe E, comme avec la hnRNP I/PTB dans le gène *c-Src*. Ce facteur empêche la communication entre un snRNP U1 et un U2AF, bloquant ainsi l'identification de l'intron où celui-ci est positionné et entraînant alors son excision (Sharma et al., 2005).

Le recrutement direct du spliceosome

Les facteurs d'épissage permettent le recrutement des composants du spliceosome en interagissant directement avec eux tout en se liant avec les régions régulatrices. Par exemple, la protéine SRSF2 liée à un ESE augmente la liaison de U2AF dans le gène de la tropine T (Wang et al., 1995). La protéine hnRNP TIA1, en se liant à un ISE, stimule l'association de la snRNP U1 dans le gène de Fas (Izquierdo et al., 2005). Par ailleurs, ces associations entre facteurs *trans* et régions régulatrices peuvent aussi empêcher l'action d'autres facteurs en masquant des régions adjacentes.

Les modifications post-traductionnelles

En tenant compte de toutes les fonctions dans lesquelles l'épissage alternatif est impliqué, il apparaît clairement que les modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, méthylation, SUMOylation) qui ciblent les composants de l'épissage ont un impact déterminant dans sa modulation. Ainsi, les protéines SR et hnRNP sont phosphorylées et déphosphorylées, modifiant ainsi leur activité et leur localisation. Elles vont interagir de manière différente avec d'autres facteurs et d'autres pré-ARNm. Par exemple, la phosphorylation de la protéine SRSF1 par la kinase Clk/Sty entraîne l'amélioration de son association avec la snRNP70 qui elle-même interagit avec la snRNP U1 (Wang et al., 1998). Lorsque la protéine Sam68 est phosphorylée, elle s'autorégule et reste dans le cytoplasme (Lukong et al., 2009). Au niveau de l'épissage, généralement les phosphorylations des protéines SR semblent augmenter leur liaison sur les pré-

ARNm (Xiao et Manley, 1997). Pour les hnRNP, la phosphorylation tend plutôt à inhiber leur activité en bloquant leur transport dans le noyau (Guil et al., 2006).

La signalisation

Pouvant être phosphorylées, les protéines SR et hnRNP sont en aval des voies de signalisation cellulaire. Cette modification, causée par un stress (génétoxique, oxydatif, thermique ou osmotique) ou par un stimulus externe, permet de déclencher une réponse qui permet à la cellule de s'adapter rapidement à une situation. Les facteurs d'épissage subissent alors des modifications post-traductionnelles qui changent leur localisation et leur activité, modifiant de la sorte l'expression de nombreux gènes dont d'autres facteurs d'épissage. Par exemple, des altérations touchant les chromosomes sont repérées par la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR). Ce stress génotoxique provoque l'acétylation et la phosphorylation de la protéine p53. Cette dernière est alors activée et peut jouer son rôle de suppresseur de tumeur. Autre exemple, dans un cas de stress externe, la protéine SRSF10 est déphosphorylée après un choc thermique. Elle est alors activée et réprime l'interaction de la snRNP U1 avec le site d'épissage 5' dans les cellules en mitose (Shin et al., 2004). L'épissage alternatif est alors inhibé dans le cycle cellulaire.

Épissage co-transcriptionnel

Il est établi que le processus de transcription et d'épissage se fait de manière couplée, ainsi lors de l'élongation de la transcription, le pré-ARNm en cours de synthèse est accessible à la machinerie d'épissage avant la fin de la terminaison de la transcription (Singh et Padgett, 2009). Il a été ainsi observé que les protéines SR sont recrutées lors de la transcription pour pouvoir agir lors de l'épissage alternatif (Das et al., 2007). Celles-ci vont interagir avec le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II via leur domaine SR. Les deux événements se déroulent donc au même endroit et au même moment et ils vont s'influencer. L'épissage alternatif est co-transcriptionnel et deux modèles, non exclusifs, peuvent permettre de comprendre ce phénomène (Kornblihtt, 2007). Le premier est celui du recrutement de facteurs. Le deuxième est le modèle cinétique. Dans le modèle de recrutement, le CTD de l'ARN pol II est utilisé comme plate-forme de fixation pour les facteurs d'épissage. Ces derniers vont être alors présents en forte concentration aux sites

d'épissage et vont impacter les décisions. Par exemple, la protéine SRSF3, en interagissant avec le CTD, module l'inclusion de l'exon 33 du gène de la fibronectine (Mata et Kornblihtt, 2006). Le deuxième modèle implique la vitesse de la transcription. Selon le temps que l'ARN pol II prend pour agir, les régions régulatrices et les sites d'épissage vont être plus ou moins libres et utilisables. Ainsi, si des régions sont trop rapidement traversées, elles ne pourront pas jouer leur rôle de régulateur, entraînant ainsi la non-sélection de sites d'épissage faibles ou la sélection de sites plus forts non-réprimés.

Le remodelage de la chromatine

L'état de la chromatine est contrôlé par différents complexes de remodelage produisant des modifications post-traductionnelles qui touchent les queues des quatre histones (acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitylation) (**Fig. 6**). La chromatine varie d'un état ouvert (euchromatine) favorable à l'élongation transcriptionnelle à un état fermé (hétérochromatine) qui est inhibiteur (Kouzarides, 2007). Il est admis que ces états sont importants dans l'initiation et l'avancement de la transcription, et étant donné le couplage transcription-épissage, un rôle a été proposé pour la chromatine dans la régulation de l'épissage alternatif.

En effet, un aspect touche la vitesse de l'ARN pol II qui peut être contrôlée par l'ouverture de la chromatine, avec l'exemple de l'acétylation de la lysine 9 de l'histone 3 qui induit un état euchromatine et l'accélération de l'ARN pol II induisant l'exclusion de l'exon 18 du gène *NCAM* (Schor et al., 2009). Un autre aspect provient du recrutement de facteur d'épissage après une modification comme pour le gène *FGFR2* où un exon n'est pas inclus à la suite de la méthylation de la lysine 36 de l'histone 3, qui induit le recrutement en cascade de la protéine hnRNP I/PTB (Luco et al., 2010). Cette activité de recrutement peut également se faire dans l'autre sens. En effet, des facteurs d'épissage peuvent interférer avec l'activité des complexes de remodelage (Zhou et al., 2011). Cet aspect de la régulation a mené à l'utilisation de composés pharmacologiques pour étudier l'effet de ces complexes dans la troisième approche de ce projet.

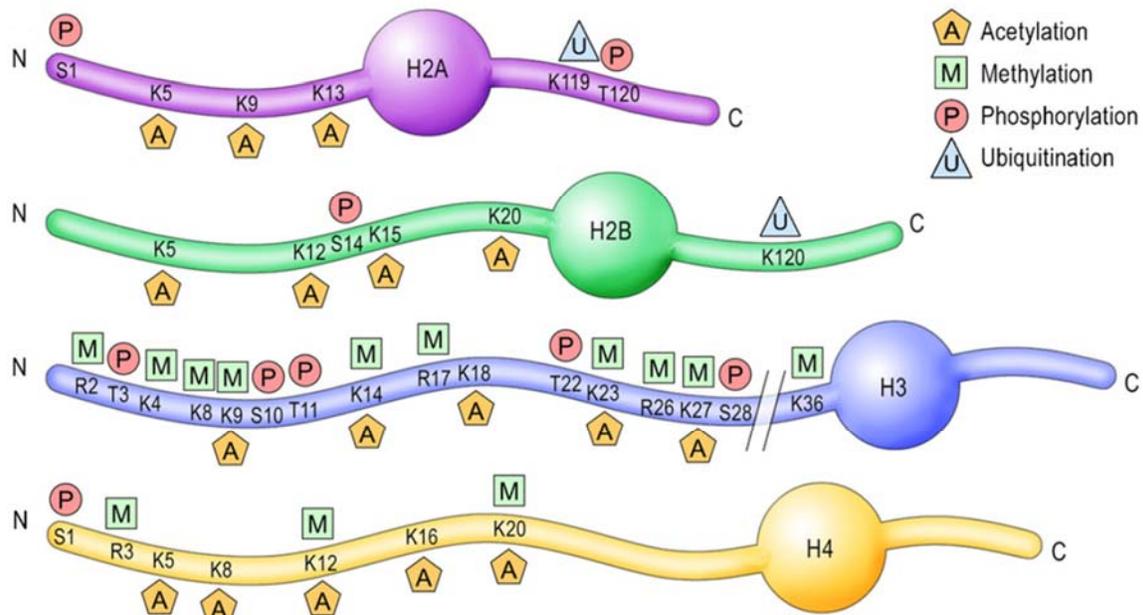


Figure 6: Les marques sur les queues des histones. Représentation schématisée des quatre histones (H2A, H2B, H3 et H4) avec leur queue N-terminale et C-terminale. Les résidus modifiés sont indiqués: A pour acétylation, M pour méthylation, P pour phosphorylation et U pour ubiquitination (adapté de Gräff et Mansuy, 2008).

Le contexte cellulaire

Le profil d'épissage alternatif d'un même événement d'épissage est différent d'un type cellulaire à un autre, et même dans un même type cellulaire soumis à différentes conditions ou à différents temps (Wang et al., 2008). Les protéines SRSF9, SRSF10 et SRSF11 ont ainsi leur expression qui est réduite ou augmentée selon les tissus (Yeo et al., 2004; Shin et Manley, 2002). De plus, il peut aussi y avoir une régulation spécifique dans les lignées cancéreuses avec par exemple, Sam68 qui est surexprimé dans le cancer de la prostate ou RBFOX2 qui est sous-exprimé dans le cancer des ovaires (Busa et al., 2007; Venables et al., 2009). Il est également à noter que ces patrons d'expression peuvent évoluer selon le stade du cancer étudié. Donc, d'après les ratios entre les isoformes, un indicateur de l'avancement de la maladie peut être obtenu.

Structure secondaire des pré-ARNm

La structure secondaire des pré-ARNm peut également jouer un rôle régulateur dans l'épissage alternatif en permettant de maintenir ou de bloquer des régions simples brins, contenant des séquences de liaison, qui sous cet état sont accessibles ou non à des facteurs d'épissage. Un exemple l'illustrant est la structure tige-boucle formée par l'interaction des protéines hnRNP A1 qui se fixant de part et d'autre de l'exon 7B, induisent son excision (Blanchette et Chabot, 1999; Nasim et al., 2002). Par ailleurs, la présence des structures secondaires est possible selon la fenêtre de disponibilité du pré-ARNm avant qu'il ne soit recouvert de protéines de liaison. Par exemple, hnRNP F, en se liant à *Bxl-x*, prévient la formation d'une tige-boucle répressive (Dominguez et al., 2010).

Si ces mécanismes de régulation ne sont pas précisément contrôlés, les dérégulations potentiellement néfastes apparaissent qui vont avoir un impact sur beaucoup d'événements cellulaires pouvant entraîner des maladies telles que le cancer. En effet, l'épissage alternatif a un rôle dans des processus cellulaires importants tels que l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la migration et la survie dans des conditions de stress. Néanmoins, il faut tenir en compte que les altérations ne sont pas uniquement négatives. Elles peuvent créer de nouveaux isoformes d'ARNm et ainsi de nouvelles protéines qui pourront avoir des fonctions déterminantes dans certains conditions. Elles jouent donc un rôle dans l'évolution des organismes en augmentant leur chance de survie.

L'épissage alternatif et le cancer

La dérégulation dans le processus d'épissage alternatif est retrouvée dans plusieurs maladies humaines telles que les maladies dégénératives et auto-immunes ainsi que cancer (Chabot et Shkreta, 2016). Le cancer est une maladie dont une recrudescence du nombre de cas est observée au fil des ans. Un objectif majeur vise à mettre au point des traitements personnalisés qui seront capables de cibler spécifiquement chaque cancer.

Les facteurs d'épissage sont maintenant considérés comme des modulateurs de l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Ils peuvent accroître ou atténuer les effets des drogues provoquant

l'apoptose. Par exemple, dans les adénocarcinomes pancréatique ductulaires, la suppression de la protéine SRSF1 permet une meilleure efficacité des traitements (Adesso et al., 2013). À l'inverse, dans les cancers des poumons et du foie, la présence de la protéine SRSF2 est nécessaire pour que les cellules soient sensibles au traitement (Ma et al., 2011).

Apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé qui est essentiel à différents stades du développement, et impliqué dans le cycle cellulaire et dans la physiologie des cellules. Il permet l'élimination des cellules qui ne sont plus nécessaires à l'organisme ou qui sont endommagées, ce qui permet le maintien de l'homéostasie des organismes multicellulaires. L'apoptose joue alors un rôle majeur dans l'élimination des cellules qui ont été endommagées par différents stress et qui pourraient devenir malignes et se propager. Ainsi, la dérégulation de l'apoptose est l'une des caractéristiques qui est retrouvée dans le cancer (Fuchs et Steller, 2015).

L'apoptose se divise en deux voies: intrinsèque et extrinsèque (**Fig. 7**). La première implique l'activation de la mitochondrie via des stress tels que des dommages à l'ADN. Les gènes de la famille Bcl-2 y sont impliqués de manière pro-apoptotique (*Bak*, *Bax*, *Bid* et *Bim*) ou anti-apoptotique (*Bcl-xL* et *Mcl-1*). Ainsi, ces protéines stimulent ou inhibent le largage du cytochrome c à la suite de la perte de la membrane externe MOM (*mitochondrial outer membrane*). Relâchée, la Cytochrome C forme alors un complexe avec Apaf-1 et la caspase-9 qui va activer la caspase-3.

La deuxième voie est activée par les ligands TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), Fas ou TNF- α se fixant aux récepteurs de la mort, sur la membrane de la cellule. Le recrutement de protéines adaptatrices TRADD ou FADD se produit alors et le complexe DISC (*death-inducing signaling complex*) se forme. Celui-ci active les caspases 8 ou 10, qui se clivent pour activer à leur tour les caspases effectrices 3, 7 et 6 qui induiront l'apoptose.

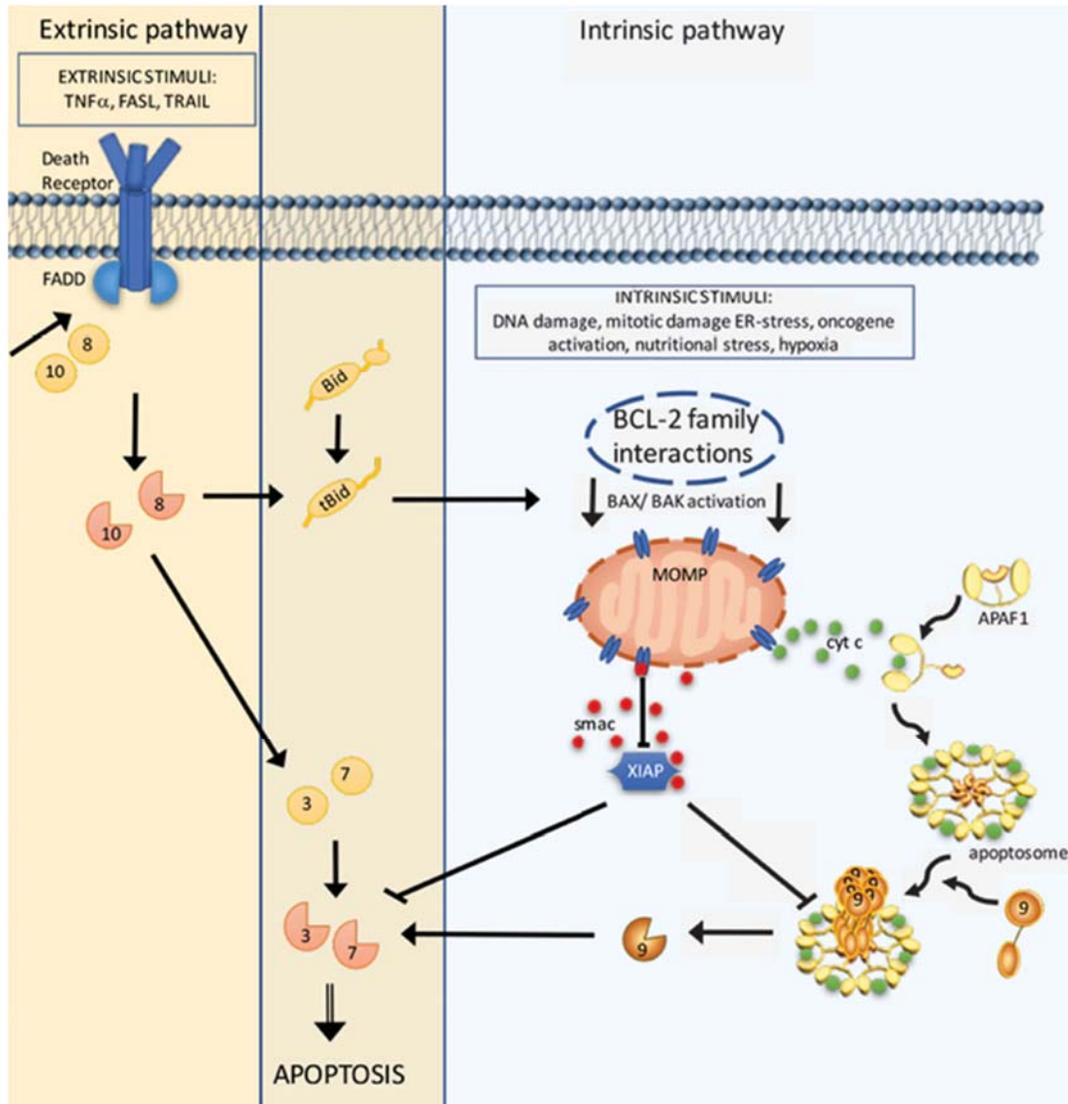


Figure 7: Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Les caspases sont représentées avec des chiffres dans des cercles complets ou non (Kalkavan et Green, 2018).

Dans les cancers, l'apoptose ne joue plus ou quasiment plus son rôle. Les dérégulations dans le contrôle de l'apoptose facilitent la survie des cellules contenant des aberrations, leur donnant la capacité de mieux survivre, de contribuer à leur prolifération puisque sans contrôle, et de résister aux traitements anti-cancéreux.

Les gènes apoptotiques ont ainsi fréquemment leur expression dérégulée dans les cancers. De plus, de manière très intéressante au niveau des deux voies de l'apoptose, l'épissage alternatif des pré-ARNm des gènes apoptotiques donne fréquemment des protéines avec des rôles antagonistes qui activent ou inhibent les programmes de mort cellulaire. Le récepteur Fas, les facteurs d'épissage tels que APAF-1, Bcl-x et les caspases sont ainsi touchés (Ruirui et al., 2013) (**Fig. 8**).

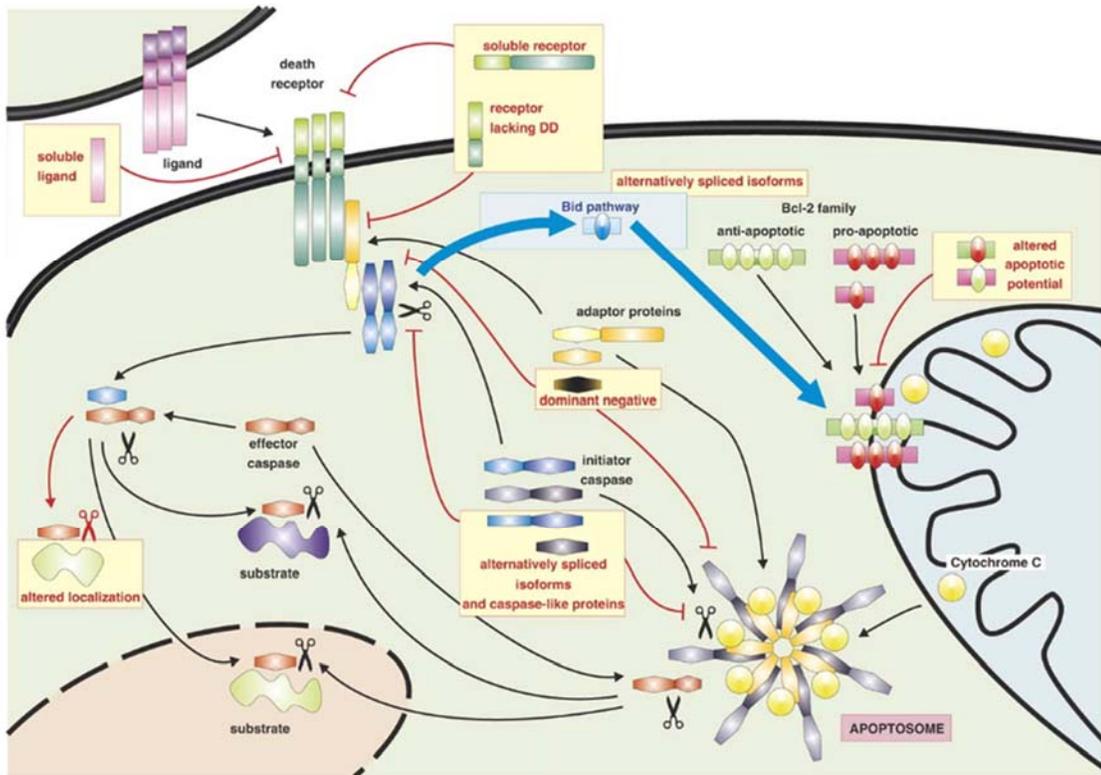


Figure 8: Schéma représentant les facteurs apoptotiques régulés par l'épissage alternatif (Schwerk et Schulze-Osthoﬀ, 2005).

Le gène *Bcl-x*

Pour étudier tous les mécanismes que nous venons de voir, le gène *Bcl-x* a été choisi comme modèle. Ce gène a déjà été étudié pour sa caractéristique liée aux fonctions antagonistes de ces deux variants d'épissage dans l'apoptose et pour son impact dans le cancer. De nombreuses équipes ont étudié le gène *Bcl-x* et beaucoup d'éléments régulateurs et de voies de signalisation ont déjà été identifiés. Il est aussi un parfait modèle pour étudier l'aspect combinatoire de la modulation de l'épissage alternatif.

Les travaux présentés ici ont voulu mieux comprendre la combinatoire entre les facteurs d'épissage déjà identifiés dans la régulation de la sélection des sites d'épissage xS et xL. Mon travail, qui se concentre sur un exemple précis, se distingue donc des études à large échelle qui se concentrent sur le rôle des facteurs de manière globale sur tout le génome.

Bcl-x est un membre de la famille des gènes Bcl-2. Toutes les protéines Bcl-2 régulatrices sont reliées par leur structure et contiennent de 1 à 4 domaines BH (Bcl-2 homologue). D'après leur homologie de séquence et de fonction dans l'apoptose, les protéines Bcl-2 sont classées en 3 groupes: anti-apoptotique avec plusieurs domaines BH, pro-apoptotique avec plusieurs domaines BH et pro-apoptotique avec seulement 1 domaine BH.

Bcl-x est impliqué dans l'apoptose, via le contrôle des pores de la membrane de la mitochondrie. Il est donc un composant important de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'épissage alternatif de son pré-ARNm passe par l'utilisation ou non d'un site d'épissage alternatif 5'. Cela mène à l'inclusion ou l'exclusion d'une partie de l'exon 2, ce qui produit deux isoformes majeurs ayant une activité antagoniste: un long isoforme Bcl-xL anti-apoptotique et un court Bcl-xS pro-apoptotique (**Fig. 9**). En conservant tous les domaines BH, Bcl-xL garde le rôle anti-apoptotique. Le produit final de Bcl-xS est plus court de 170 acides aminés et ne contient plus les domaines BH1 et BH2 (Clarke et al., 1995).

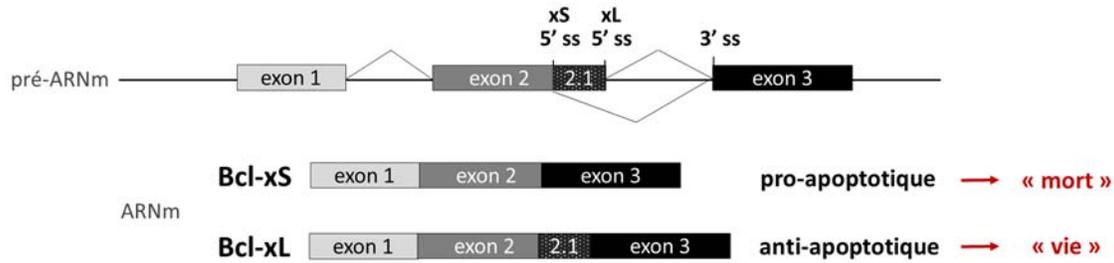


Figure 9: Épissage alternatif de *Bcl-x*. Structure du pré-ARNm humain de *Bcl-x* avec ses deux variants d'épissage majeur: le court pro-apoptotique Bcl-xS et le long anti-apoptotique Bcl-xL. Les rectangles représentent les exons. ss : *splicing site* / site d'épissage.

Bcl-xL inhibe l'apoptose par différents mécanismes. Il peut directement inhiber Bax ou induire la translocation de MOM lié à Bax dans le cytoplasme. Bcl-xL peut aussi séquestrer tBid qui est un activateur de Bax. Les actions de Bcl-xL sont d'inhiber la perméabilisation de la membrane extérieure de la mitochondrie (MOMP) et de bloquer l'apoptose. Une augmentation de l'expression de Bcl-xL est associée à une progression dans le cancer du sein chez la souris (España et al., 2004). Il joue aussi un rôle important dans la résistance à la chimiothérapie.

Bcl-xS intervient dans le blocage de la mort cellulaire en interférant avec l'action de Bcl-xL et des autres protéines de la famille Bcl-2 qui inhibent l'apoptose. Ces protéines ne peuvent donc plus bloquer MOMP et le largage du Cytochrome C dans le cytoplasme. En effet, Bcl-xS stimule l'apoptose en interagissant et inhibant Bcl-xL et Bcl-2, induisant la coupure d'interaction entre Bak et VDAC2 et donc libérant Bak (Plötz et al., 2012). Dans des cellules normales, la production du variant Bcl-xS est fortement réduite. Cette répression change à la suite de différents stress tels que des dommages à l'ADN.

Les régulations de *Bcl-x*

Due à son implication critique dans la vie de la cellule, la régulation de l'épissage alternatif de *Bcl-x* a été attentivement étudiée pour identifier les mécanismes qui influencent le ratio entre les isoformes pro- et anti-apoptotiques. De nombreux facteurs et régions régulatrices ont ainsi été identifiés par notre équipe, dont des protéines SR et hnRNP (**Fig. 10**). Nous allons discuter maintenant des associations entre certains d'entre eux.

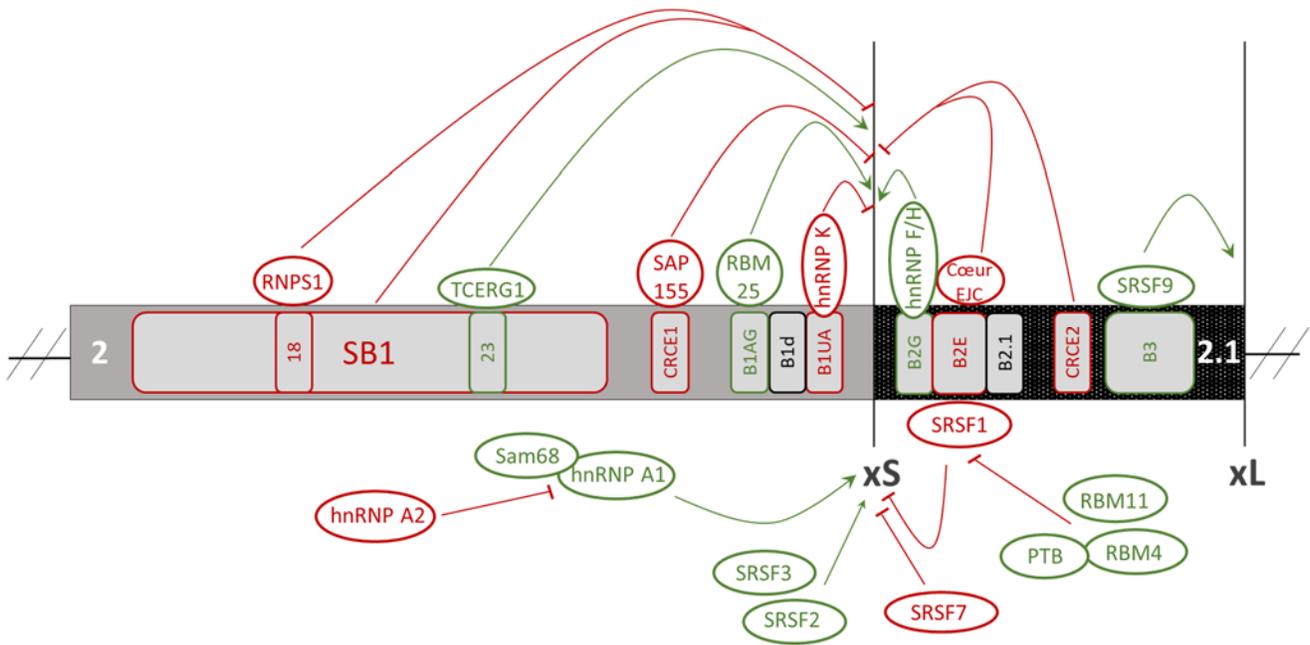


Figure 10: Le contrôle de l'épissage de *Bcl-x*. Aperçu de certains des facteurs impliqués dans la modulation de la sélection des sites d'épissage xS et xL via des stimulations (en vert) ou des répressions (en rouge).

Dans la région B1UA, située en amont de xS, la protéine hnRNP K se fixe à des éléments riches en C dans la sous-région B1, et inhibe l'utilisation de xS (Revil et al., 2009). Le facteur hnRNP F/H, se liant avec un élément riche en G dans la sous-région B2G, est essentiel pour favoriser l'utilisation du site xS (Garneau et al., 2005). L'étude de l'épissage alternatif de *Bcl-x* a révélé de nouveaux rôles pour des complexes déjà connus comme l'EJC (Exon Junction Complex). Ainsi, après leur synthèse, l'EJC est déposé par le spliceosome à environ 24 nt en amont des jonctions exoniques (Le Hir et al., 2000). L'EJC est composé d'une quinzaine de protéines divisées en deux ensembles. Le premier ensemble forme le cœur de l'EJC constitué de quatre protéines: l'hélicase à boîte DEAD eIF4A3 (*eukaryotic initiation factor 4A3*), MLN51 (*Metastatic Lymph Node 51*), et l'hétérodimère Magoh/Y14. Ensemble, ces protéines permettent la liaison stable de l'EJC sur l'ARNm. Ensuite, ce cœur sert de plate-forme d'ancrage pour un deuxième ensemble (Tange et al., 2004; Le Hir et Andersen 2008). Celui-ci est composé de divers facteurs périphériques qui s'associent de manière dynamique et temporaire avec le cœur. On retrouve ainsi des facteurs d'épissage comme RNPS1, Pinin, SAP18 et Acinus qui forment le complexe ASAP (*Apoptosis and Splicing Associated Protein*), des facteurs de transport d'ARNm (UAP56, REF/Aly,

TAP/p15), des facteurs de NMD (Upf1, Upf2, Upf3) et des facteurs de traduction (SKAR). Son rôle le plus documenté et par lequel il a été découvert est celui joué dans le mécanisme de contrôle qualité appelé NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) (Isken et Maquat, 2007; Kervestin et Jacobson, 2012). Ce dernier permet d'identifier et de dégrader les ARNm contenant un codant prématuré de terminaison (PTC) qui pourrait être traduit en protéine tronquée potentiellement néfaste pour la cellule. La présence d'un EJC en aval d'un codon stop constitue le signal déclencheur du NMD. L'EJC a ainsi un rôle dans la stabilité des ARNm. Dans le cas de *Bcl-x*, la suppression d'eIF4A3 et d'Y14, de RNPS1, d'Acinus et SAP18 augmente la production de *Bcl-xS* (Michelle et al., 2012). Un de ces effets passe par une zone où se lie RNPS1 au cœur de la région SB1 (région 18), en amont du site xS et par la région B2E dans B2, en aval du site xS, qui est nécessaire à l'action d'eIF4A3 et Y14. La disposition de ces facteurs, qui sont connus pour interagir ensemble, suggère qu'ils pourraient dans ce cas s'associer ensemble pour former une structure de boucle pour inhiber l'utilisation du site xS. Dans la dernière étude du laboratoire, il a été montré que SB1 est associé à 14-3-3 ϵ qui est lui-même un facteur associé à la protéine SRSF10. SRSF10, 14-3-3 ϵ , hnRNP A1 et Sam68 jouent ainsi surtout un rôle dans la transition qui permet la levée de la répression du site xS lors de dommages à l'ADN produit par l'oxaliplatine. Lors de ce passage, les répresseurs hnRNP K et RNPS1 partent et permettent l'arrivée d'activateurs comme hnRNP F/H (Cloutier et al., 2018) (**Fig. 11**).

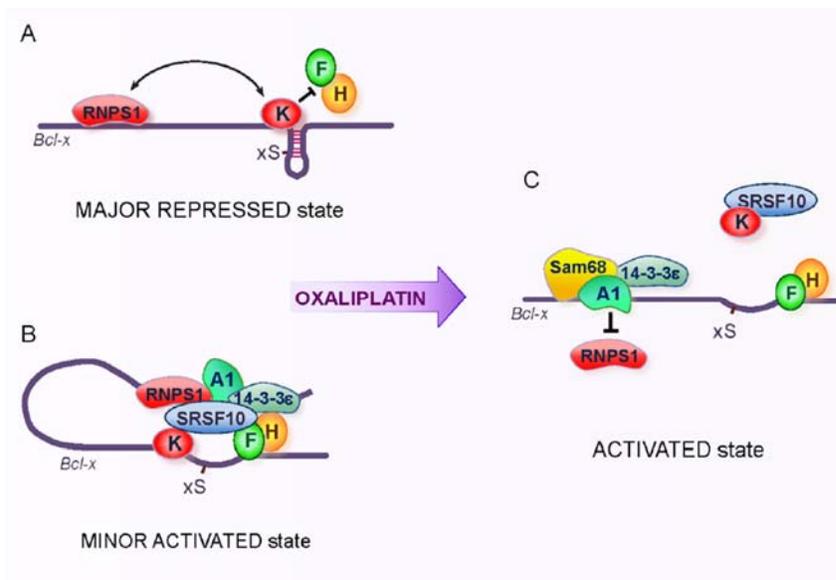


Figure 11: Changement des régulations du pré-ARNm après un stress de dommages à l'ADN. A. État majoritaire de régulation dans des cellules normales. B. État minoritaire de régulation dans des cellules normales. C. L'utilisation de l'oxaliplatine provoque un changement dans les interactions des facteurs menant un nouvel état de régulation de l'épissage (Cloutier et al., 2018).

L'approfondissement des travaux a montré que l'élément SB1 est ainsi un élément répresseur de xS. C'est aussi un acteur final de deux voies activatrices du site xS: la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour *Damage response*) mise en évidence par le traitement à l'oxaliplatine, drogue qui induit des dommages à l'ADN (Shkreta et al., 2011; Shkreta et al., 2016) et la voie de la protéine kinase C (PKC), découverte par l'utilisation de la drogue staurosporine, inhibitrice de kinase (Revil et al., 2007) (**Fig. 12**). Il est à noter que l'effet de la staurosporine n'est observable que dans les cellules cancéreuses, indiquant qu'un ou des acteurs ne sont plus présents, activés ou résistants. Par ailleurs, le laboratoire a analysé les effets de 20 drogues dans 6 lignées cellulaires (Shkreta et al., 2008). Les drogues affectent un panel de gènes, incluant les gènes apoptotiques. L'amplitude de leur impact et l'effet varient parmi les gènes touchés et selon les lignées cellulaires. Il a fallu se pencher sur les mécanismes impliqués et ainsi l'effet de l'oxaliplatine et de la staurosporine a montré la convergence des voies PKC et DDR. La voie PKC peut moduler la DDR sans l'élément SB1 avec les régions B1UA et B2G et aide à bloquer l'effet inhibiteur de SRSF10 et hnRNP F/H (Shkreta et al., 2016).

La région B2, située entre les sites xS et xL et divisée en trois parties (B2G, B2E et B2.1), est la cible de nombreux autres facteurs. Ainsi, la protéine SRSF1, en s'y fixant, réprime l'utilisation du site xS avec l'aide de Pinin (Li et al., 2003; Naro et al., 2014). SRSF1 favorise la production de *Bcl-xL* mais son rôle est contrebalancé par la compétition des protéines RBM4 (Wang et al., 2014), RBM11 (Pedrotti et al., 2012) et hnRNP I/PTB (Bielli et al., 2014) qui vont promouvoir l'utilisation du site xS. Réciproquement, la surexpression de SRSF1 réduit l'interaction de PTB sur les ARNm et accroît la production de *Bcl-xL* (Cloutier et al., 2008). La phosphorylation de SRSF1 par les kinases SRPK1 et NEK2 mènent également à un épissage vers *Bcl-xL*. D'autres facteurs jouent également un rôle positif (SRSF3 et SRSF2) ou négatif (SRSF7) (Merdzhanova et al., 2008). Dans la région B3, il y a un site de fixation pour SRSF9 qui promeut l'utilisation du site xL en empêchant la liaison du snRNP U1 à site pseudo 5' (Garneau et al., 2005). La protéine RBM25 se lie à la sous-région B1AG et stimule l'utilisation de xS en aidant la liaison de la snRNP U1 (Zhou et al., 2008). Les éléments CRCE1 et CRCE2 (*Ceramide-responsive RNA cis-element 1*) stimulent positivement le site xS sous l'effet de la céramide via l'activation de la phosphatase PP1 qui constitue un point important de convergence de plusieurs cascades de signalisation. (Chalfant et al., 2002). Le facteur SAP115 va interférer et inhiber l'utilisation de xS via l'élément CRCE1 (Shultz et al., 2012). En effet, cette protéine entraîne la déphosphorylation et inhibe

l'action de PP1 (Tanuma et al., 2008). Pour CRCE2, le facteur impliqué dans son inhibition de xS reste inconnu (Chalfant et al., 2002).

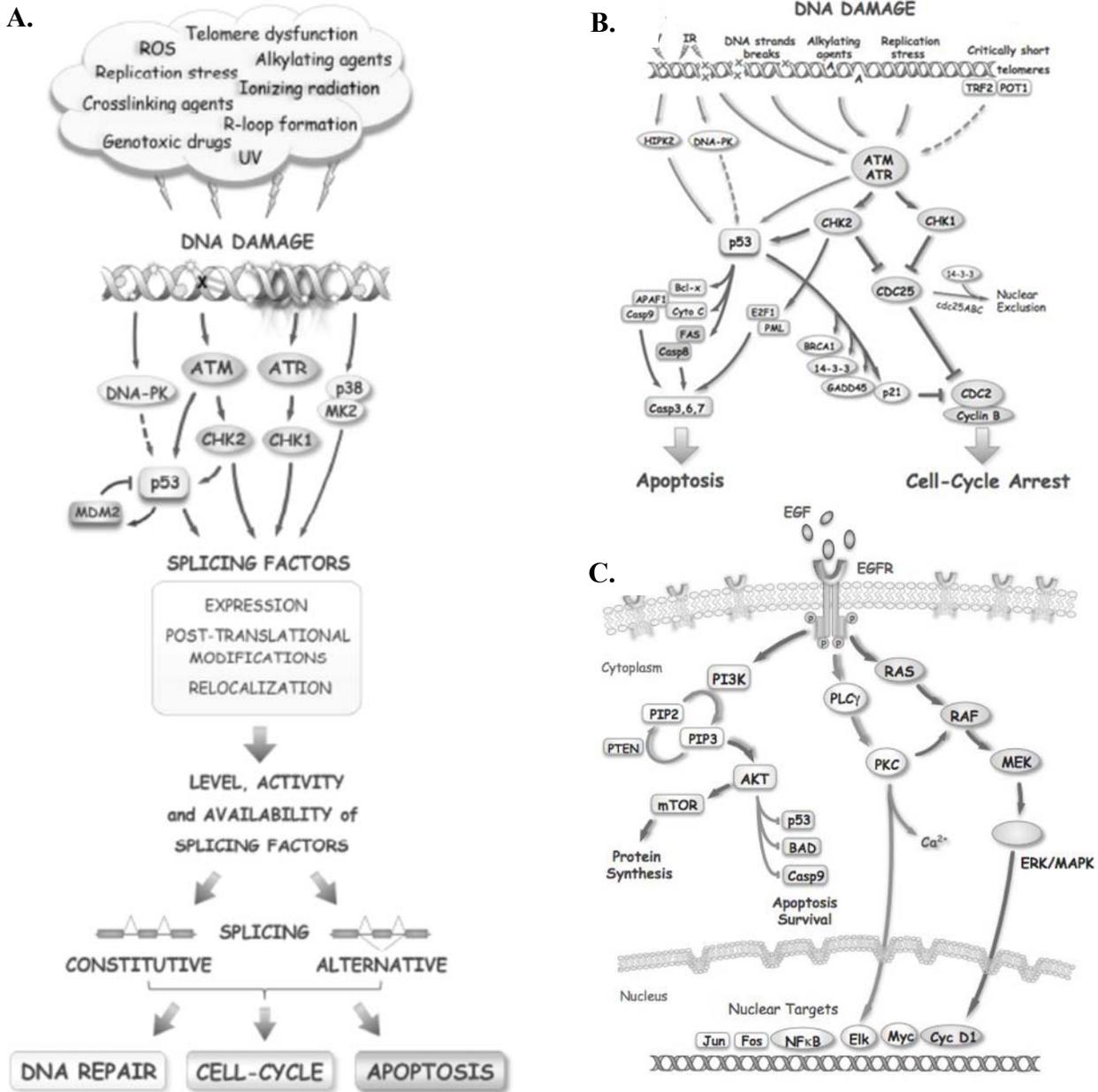


Figure 12: Voies de signalisation pertinente à l'épissage alternatif. **A.** Liens entre les réponses aux dommages à l'ADN et l'épissage alternatif. Les voies de signalisations des dommages à l'ADN modulent les facteurs d'épissage qui eux-mêmes vont avoir un impact sur l'épissage d'éléments impliqués dans la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose. Impact des dommages à l'ADN sur l'épissage alternatif. **B.** Détails sur les voies de signalisations des réponses aux dommages à l'ADN qui convergent vers le contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire. Les effets présentés sont sur la stabilité et l'expression des protéines. **C.** Détails de la voie de signalisation EGF où l'axe PKC est impliqué dans la régulation de l'épissage de *Bcl-x* tout comme les axes PI3K/AKT et KRAS/BRAF via les régulations des facteurs SRSF1 et Sam68. (Shkreta et al., 2015)

Il a également été mis en évidence que Sam68 interagit avec hnRNP A1 pour favoriser la production de *Bcl-xS* (Cloutier et al., 2018). L'action de Sam68 est empêchée par hnRNP A2/B1 qui bloque l'association de Sam68 phosphorylé et réduit la production de *Bcl-xS* (Paronetto et al., 2007). La phosphorylation de Sam68 par Fyn induit en revanche la production de *Bcl-xL*, ce qui est retrouvé dans les cancers du pancréas. Les études sur *Bcl-x* ont montrées également le couplage entre l'épissage alternatif et la transcription. Cela est illustré par exemple avec la protéine TCERG1 (*Transcription Elongation Regulator 1*) qui est impliquée dans le contrôle de la transcription et de l'épissage alternatif via l'élément SB1. Celle-ci ralentit l'ARN pol II tout en empêchant la venue de facteur répresseur permettant l'utilisation du site xS (Pearson et al., 2008).

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'insèrent dans l'ensemble des recherches qui visent à mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif pour à terme découvrir et savoir utiliser des outils pour lutter contre certains cancers.

Pour cela trois approches ont été débutés lors de ma maîtrise pour tenter de répondre à trois interrogations. Dans chacune, *Bcl-x*, gène modèle du laboratoire, est utilisé pour poursuivre avec la continuité et les références des études précédentes du laboratoire.

- 1) La première approche vise à décortiquer en combinaison et dans un contexte simple, les relations entre des facteurs d'épissage identifier auparavant au laboratoire dans différentes études. Ainsi un minigène est utilisé pour disséquer les règles combinatoires entre quatre facteurs de régulation connus de *Bcl-x* : RNPS1, eIF4A3, hnRNP K et hnRNP F/H. Cette approche a été réalisés *in vitro* et *in vivo* pour tester les différences entre ces contextes.

Ces essais permettront de déterminer si cette approche est viable et si elle permet d'élucider des règles d'interactions pouvant être ensuite applicable à d'autres facteurs.

- 2) La deuxième approche vise à observer comment deux drogues (oxaliplatine et staurosporine) affectent l'épissage alternatif d'un lot d'événement d'épissage dans trois contextes cellulaires différents avec les lignées HEK293, HCT116 et HIEC. Ces drogues causent des changements dans les interactions entre les facteurs d'épissage et les ARNm en affectant les voies de réparations de l'ADN et la voie PKC.

Ces tests permettront de confirmer et visualiser les différences entre lignées cellulaires et de tenter d'identifier à l'aide des modulations des épissages alternatifs des événements, des facteurs qui pourrait expliquer les observations.

3) La troisième approche cherche à entrevoir un nouveau niveau de régulation de l'épissage alternatif en lien avec l'état de la chromatine. Ainsi, des composés pouvant affecter son état, combinés au non à l'oxaliplatine, ont été utilisés. Sur le même lot d'événement d'épissage, les expériences permettront en premier de déterminer si des composés ont un effet et en deuxième, avec l'oxaliplatine, de voir si des nouveaux effets sont observés et s'ils peuvent apporter des réponses quant à l'action de la drogue.

Matériel et méthodes

Culture et extraction cellulaire

Les cellules HEK293 (cellules embryonnaires de rein), HCT116 (cellules épithéliales cancéreuses d'intestin) et HIEC (cellules non cancéreuses de colon) sont cultivées dans du milieu DMEM (Life Technologies) à 4,5 g/L D-glucose supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'un mélange d'antibiotiques (100 µg/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline) à 37°C, 5% de CO₂. Pour le repiquage, les cellules sont lavées au PBS puis incubées dans de la trypsine pendant 5 min à 37°C. Finalement, après désolidarisation, 2 x 10⁶ cellules sont suspendues dans du nouveau milieu.

Les extraits cellulaires sont préparés à partir des trois lignées. 20 x 10⁶ cellules sont lavées et récoltées dans du PBS 1X. Le culot obtenu est centrifugé et le surnageant est éliminé. Pour faire la lyse totale, les cellules sont suspendues dans du tampon RIPA (Tris-HCl pH 7.5 1 M, NaCl 5 M, Na₂EDTA 0,5 M, EGTA 0,5 M, NP-40 10%, Sodium Deoxycholate 10%, Aprotinin 1,7 mg/mL, Leupeptin 1 mg/mL, Pepstatin A 1,6 mg/mL, PMSF 17 mg/mL et RQ1 DNase). Les cellules sont alors mélangées, centrifugées puis le surnageant est récupéré (50 µL sont conservés comme extrait total). Finalement, la concentration protéique est mesurée à l'aide d'un test au Bradford.

Constructions des plasmides

Plasmides encodant les pré-ARN messagers

Les ARN pré-messagers 77BAd ont été décrits dans Nasim et al. (2002). Les différents variants 77BAd+hnRNP K, 77BAd+hnRNP F/H, 77BAd+hnRNP K+ hnRNP F/H, 77BAd+eIF4A3, 77BAd+RNPS1 et 77BAd+eIF4A3+RNPS1 ont été générés par l'insertion de sites de liaison pour les facteurs d'épissage en amont et en aval du site d'épissage 5' de l'exon 7B. Pour hnRNP K, la séquence TCCAGCTCCACATCACCCC est insérée à 20 nucléotides (nt) en amont du site d'épissage 5'. Pour hnRNP F/H, la séquence TCCGGGATGG est insérée à 16 nt en aval du site d'épissage 5'. Pour eIF4A3, la séquence ATTGTGGCCTTTTTCTCCTT est insérée à 113 nt en amont du site d'épissage 5' et pour RNPS1, la séquence GAAGAGAACA est insérée à 23 nt en aval du site d'épissage 5'. Ces insertions ont été réalisés par « Overlap extension PCR ». Pour

réaliser cela, des oligonucléotides (Integrated DNA Technologies) ont été générés possédant la séquence en amont ou en aval du site d'épissage 5' et de la séquence à insérer. Une série de PCR est alors réalisée permettant d'obtenir successivement les différentes parties encodant le nouveau pré-ARNm pour les associer ensemble par PCR en utilisant des oligonucléotides aux extrémités de 77BAd.

Ces constructions et le plasmide Dup5.1, décrits dans Chabot et al. (1997), ont été digérés par endonucléases de restriction aux sites KpnI et ScaI. Les fragments ont été purifiés sur gel d'agarose selon les instructions (Qiagen, DNA Plasmid Purification Kit) et déphosphorylés en présence de 5 U de Antarctic phosphatase (NEB) et de tampon ANT 1X (NEB). La ligation a été réalisée avec la ligase ADN T4 (NEB). Tous les plasmides ont été séquencés avant leur utilisation.

Séquences des oligonucléotides pour les PCR

77BAd fwd 5'- AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG -3'
77BAd rev 5'- GATCTAGAGCTCCACTCGAGGTCAACC -3'
+K fwd 5'- TCCCAGCTCCACATCACCCCGGCGGAGGCGGCTTTGGCGG -3'
+K rev 5'- GGGGTGATGTGGAGCTGGGATCCTCCGTTGTTATAGCTGT -3'
+F/H fwd 5'- TCCGGGATGGTCGAATTCGATATCAAGCTT -3'
+F/H rev 5'- CCATCCCGGATCTACTGGATACCTACCACT -3'
+eIF4A3 fwd 5'- ATTGTGGCCTTTTTCTCCTTGATATCAAGCTTGACCTGCA -3'
+eIF4A3 rev 5'- AAGGAGAAAAAGGCCACAATGAATTCGATCTACTGGATAC -3'
+RNPS1 fwd 5'- GAAGAGAACAGGTGCAGCCCTG -3'
+RNPS1 rev 5'- TGTCTCTTCCGGGATCCTGCAG -3'

Transcription tiède *in vitro*

Les plasmides sont linéarisés par l'enzyme de restriction ScaI pour produire les pré-ARNm tièdes pour l'épissage *in vitro*. Les pré-ARNm sont générés avec l'ARN polymérase T7 (NEB) dans ces conditions: 1 µg de plasmide linéarisé, 3 µl de tampon MasterMix (NEB), 2 µl d'UTP 40 µM, 1 µl d'ARN polymérase T7 (NEB) et 0,25 µl d' $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (800Ci/mmol, PerkinElmer Life Science). Le volume total est de 20 µl.

Après 1 h d'incubation à 37°C, les réactions sont migrées sur un gel d'acrylamide (38:2) dénaturant (8 M Urée). La bande correspondant aux pré-ARNm est découpée, extraite dans 500 µl de tampon d'extraction (0.3 M acétate de sodium, 0,2% SDS) et purifiée 3 fois dans 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). Les ARN sont précipités dans 1 mL d'éthanol 100%, suspendus dans 10 µl d'H₂O nanopure et conservés à -80°C.

Épissage *in vitro*

Pour une réaction d'épissage 1 µl de transcrit est incubé avec 2,5 µl d'extrait nucléaire de cellule HeLa S3, 8,5 µl de tampon contenant : 3,2 µl de mM de MgCl₂ 20 mM de créatine phosphate, 0,5 µl mM de rATP, 1 U de créatine kinase, 2,6% de PVA, 1,7 mM de DTT, 0,7 U de RNAGuard (Roche), 5% de tampon D) pendant 2 h à 30°C.

Les ARN sont récupérés et extraits dans 500 µl de tampon d'extraction (0.3 M acétate de sodium, 0,2% SDS) et purifiés 3 fois dans 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). Les ARN sont précipités dans 1 mL d'éthanol 100%, suspendus dans 10 µl d'H₂O nanopure et conservés à -80°C.

Extraction d'ARN total

Les ARN totaux des cellules HEK293, HCT116 et HIEC sont extraits au Trizol (Invitrogen) en suivant le protocole du fabricant. Les ARN sont suspendus dans 10 µl d'H₂O nanopure.

Épissage *in vivo*

Les cellules HEK293, HCT116 et HIEC sont cultivées à 37°C (5% CO₂) dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS). 5 x 10⁵ cellules dans 500 µl de DMEM sont déposées dans des puits 60 mm. Après 48 h, 1 µg de plasmide et 4 µg de polyéthylèneimine (1µg/µl) (Polysciences Inc) contenu dans 200 µl d'Opti-MEM ont été ajoutés aux cellules. Après 4 h, 1,5 ml de DMEM est ajouté et 24 h post-transfection, les cellules sont récoltées et les ARN totaux sont extraits au Trizol.

Traitements avec les drogues

Les cellules HEK293, HCT116 et HIEC sont cultivées à 37°C (5% CO₂) dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS). 5 x 10⁵ cellules dans 500 µl de DMEM sont déposées dans des puits 60 mm. Après 24 h, lorsqu'elles sont à 70% de confluence, 1,5 ml de DMEM avec ou sans l'oxaliplatine (100 µM) et avec ou sans la stauroporine (60 nM) (Calbiochem) sont ajoutés. Après 20 h, les cellules sont récoltées et les ARN totaux sont extraits au Trizol.

Traitements avec les drogues et les composés

Les cellules HEK293, HCT116 et HIEC sont cultivées à 37°C (5% CO₂) dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS). 3 x 10⁵ cellules dans 500 µl de DMEM sont déposées dans des puits 60 mm. Après 24 h, les 14 composés, dilués dans du DMSO, (GSK8814, BAY-850, BAZ2801, BAZ2-ICR, BI-9564, NI-57, GSK6853, BAY-299, SGCCBP30, ICBP112, NVS-CECR2-1, PFI-3, GSK484 et JQ1) sont ajoutés à une concentration de 2,5 µM. 24 h plus tard, les drogues (oxaliplatine (100 µM) et la stauroporine (60 nM)) sont ajoutées puis après 20 h, les cellules sont récoltées et les ARN totaux sont extraits au Trizol.

Détection des produits d'épissage par RT- PCR

Les pré-ARNm de tous les transcrits ont été détectés par RT-PCR à partir des extractions d'ARN total. 1,8 µl d'ARN est incubé avec 0,5 µl de tampon 10X (Omniscript, Qiagen), 0,5 µl de dNTP (0,5 mM), 0,075 µl de RNase Out (Roche), 0,2 µl d'oligonucléotide antisens (10 µM) et 0,25 µl de transcriptase inverse (Omniscript, Qiagen) dans un volume total de 5 µl. Les réactions sont incubées à 37°C pendant 1 h.

Pour la PCR, 1,8 µl d'ADN obtenu par RT est mélangé avec 2,5 µl de tampon 10X (NEB), 0,225 µl de dNTP (10 mM), 0,5 µl de chaque amorce (10 µM), 1 U de polymérase TAQ (NEB) et 0,1 µl d'adCTP (Fischer). Les réactions suivent le protocole suivant:

94°C	2 min	
94°C	30 sec	} X 35
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	

72°C 5 min

Les échantillons amplifiés sont séparés sur gel d'acrylamide 4% (29:1, acrylamide, Bis-acrylamide) non-dénaturant et visualisés à l'aide d'un Storm Phosphorimager 860 (GE Healthcare) par autoradiographie. L'analyse de l'intensité des bandes a été quantifiée avec le logiciel Image-Quant (GE Healthcare).

Séquences des oligonucléotides pour les RT-PCR pour les expériences *in vitro*

T35' (sens) 5'- GGGAACAAAAGCTGGGTACCG -3'

Ead (antisens) 5'- GAGTTTGTCTCAACCGCGA -3'

Séquences des oligonucléotides pour les RT-PCR pour les expériences *in vivo*

Ge1 (sens) 5'- ACACAACCTGTGTTCACTAGC -3'

Ge2 (antisens) 5'- AGTGGACAGATCCCCAAAGG -3'

Pour l'étude à grande échelle des profils d'épissage des 57 événements d'épissage, les RT-PCR ont été effectués par la plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke. La transcription inverse a été faite en utilisant 10 U de transcriptase inverse Transcriptor, 20 U de RNaseOUT (Invitrogen), 3,2 µg d'hexamères aléatoires, 1 µM de mix dNTP, 1X de tampon de réaction Transcriptor RT et 1 µg d'ARN total. Le PCR a été effectué en utilisant 0,2 unités de polymérase Platinum Taq, 0,6 µM d'amorces, 1,5 mM de MgCl₂, 10 ng d'ADN complémentaire, 1X de tampon de réaction PCR et 200 µM de mélange dNTPs.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans des thermocycleurs GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Scientific-Invitrogen).

95°C	15 min	
94°C	30 sec	} X 35
55°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	10 min	

La visualisation et l'analyse des produits d'amplification ont été effectuées par électrophorèse capillaire avec la micropuce des instruments Labchip GX Touch HT (Perkin Elmer).

Résultats

Cette section est divisée en trois parties couvrant les trois approches que j'ai menées durant ma maîtrise et qui sont détaillées dans les objectifs à la fin de l'introduction.

Partie 1: Explorer la mécanique combinatoire d'éléments régulateurs de l'épissage alternatif de *Bcl-x*

Depuis une dizaine d'années, les études menées sur le gène *Bcl-x* ont permis de révéler de nombreux éléments régulateurs impliqués de façon positive ou négative dans la sélection des sites d'épissage xS et xL. Ainsi, bien que les travaux réalisés aient apporté de nombreuses informations, ces derniers se sont concentrés sur chaque élément de manière individuelle. Il est donc intéressant de se demander si ces différents éléments interagissent ensemble pour accomplir leur rôle et, si tel est le cas, de quelle façon cela se produit.

L'objectif de cette première approche est de comprendre cet aspect combinatoire. Pour cela, nous avons inséré des séquences qui normalement lient des protéines étudiées précédemment, c'est-à-dire dans ce cas eIF4A3, RNPS1, hnRNP K et hnRNP F/H, dans un modèle hétérogène simple. Ainsi, nous avons tenté de recréer les mécanismes de régulation présents dans la sélection du site xS dans le gène *Bcl-x*, avec des protéines qui, en se liant sur des éléments, modulent l'épissage alternatif. Ce modèle sera testé dans des essais *in vivo* et *in vitro* afin de mieux comprendre les interactions entre les différents facteurs impliqués dans l'épissage alternatif et à terme, d'étudier ces interactions de manière systématique avec d'autres protéines de liaison à l'ARN, et d'établir une banque de données des interactions possibles entre ces protéines.

Nous avons donc utilisé un ARN pré-messager modèle contenant les exons 7 et 7B alternatif, avec leur site d'épissage 5', de l'ARN pré-messager d'hnRNP A1 ainsi que l'exon L2 de l'adénovirus comme site 3' (Nasim et al., 2002) (**Fig. 13.A**). Cet ARN pré-messager, nommé 77BAd pour la suite du mémoire, porte ainsi un événement d'épissage 5' alternatif avec deux sites 5' d'épissage en compétition, comme dans le gène *Bcl-x*. De plus, 77BAd ne contient pas d'éléments régulateurs

connus, ce qui permet d'espérer que les changements observés viendront uniquement des éléments testés. Cependant, avec les avancées dans la découverte de protéines de liaison à l'ARN, nous ne pourrions pas totalement écarter la présence de sites de liaison pour des protéines nouvellement identifiées.

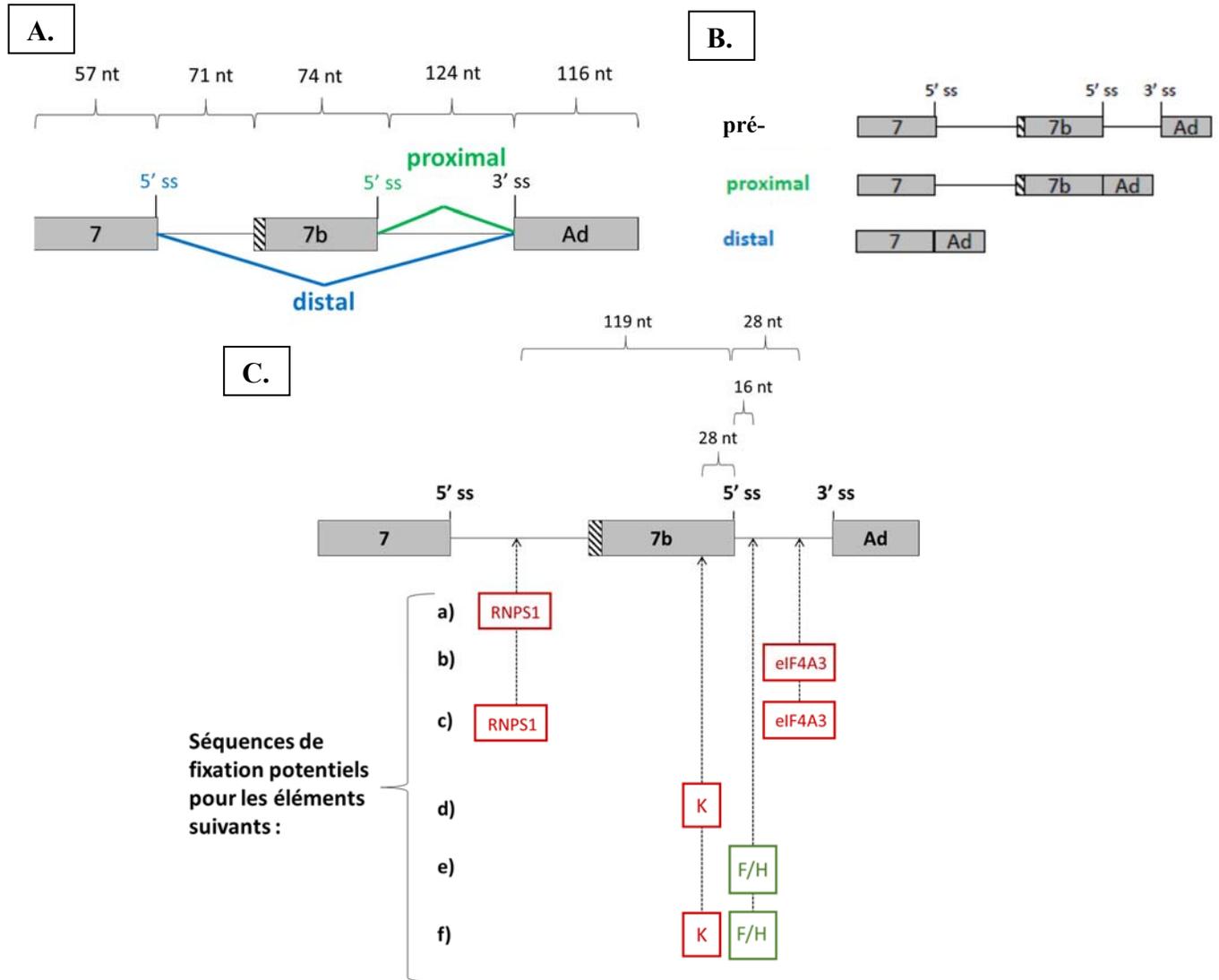


Figure 13: L'ARN pré-messager modèle 77BAAd utilisé dans les tests *in vivo* et *in vitro* afin d'étudier l'impact des éléments insérés. **A.** Structure de 77BAAd avec l'événement d'épissage alternatif de type site 5' alternatif d'épissage. Les tailles des introns et des exons sont indiquées. **B.** Structure des deux isoformes, proximal et distal, produits par l'épissage alternatif. **C.** Liste des constructions contenant les séquences de liaison attendue pour RNPS1 et hnRNP K en amont du

site 5' d'épissage alternatif proximal, et pour hnRNP F/H et eIF4A3 en aval. Les distances des différentes insertions sont indiquées par rapport au site 5' proximal. Les couleurs indiquent les effets répressifs (rouge) et positifs (vert) déjà connus. ss : *splicing site* / site d'épissage.

Pour commencer, nous nous sommes concentrés sur quatre éléments reconnus par quatre protéines de liaison différentes, soient eIF4A3, RNPS1, hnRNP K et hnRNP F/H, qui ont été testés en deux groupes, d'un côté eIF4A3 et RNPS1 et de l'autre hnRNP K et hnRNP F/H. Nous avons alors vérifié si les effets régulateurs observés sur la sélection des sites xS et xL dans *Bcl-x* par sélection des sites 5' d'épissage alternatif sont conservés dans l'ARN pré-messager modèle.

À partir d'études précédentes qui ont identifié les régions régulatrices de *Bcl-x*, des séquences de liaison modulant positivement ou négativement la sélection du site xS, ont été sélectionnées pour effectuer les tests. Pour hnRNP F/H, la séquence est comprise dans le domaine B2G (TCCGGGATGG) (Garneau et al., 2005) et pour hnRNP K, dans la région B1d (TCCAGCTCCACATCACCCC) (Revil et al., 2009), celles-ci ayant des effets négatifs. Pour RNPS1, la séquence à effet négatif est retrouvée dans la région SB1 (GAAGAGAACA) (Cloutier et al., 2018) et pour eIF4A3, la séquence à effet positif provient de la région B2E en aval du site d'épissage (ATTGTGGCCTTTTTCTCCTT) (Michelle et al., 2012). Ces séquences ont été insérées par clonage dans 77BAd en amont et en aval du site d'épissage 5' proximal, en respectant pour la plupart les distances retrouvées dans le contexte de *Bcl-x*. Dans le cas du site RNPS1, comme la séquence est trop éloignée dans *Bcl-x* (à 275 nucléotides (nt) de xS), il a été décidé d'insérer la séquence à une distance éloignée raisonnable (119 nt du 5'ss de l'exon 7B), en amont du site d'épissage proximal dans le premier intron de 77BAd (**Fig 13.C**). L'ARN pré-messager sans insertion sera appelé le contrôle (mock) et les autres pré-ARNm seront nommés d'après les noms des protéines de liaison qui devraient se fixer sur les éléments insérés.

Essais in vitro

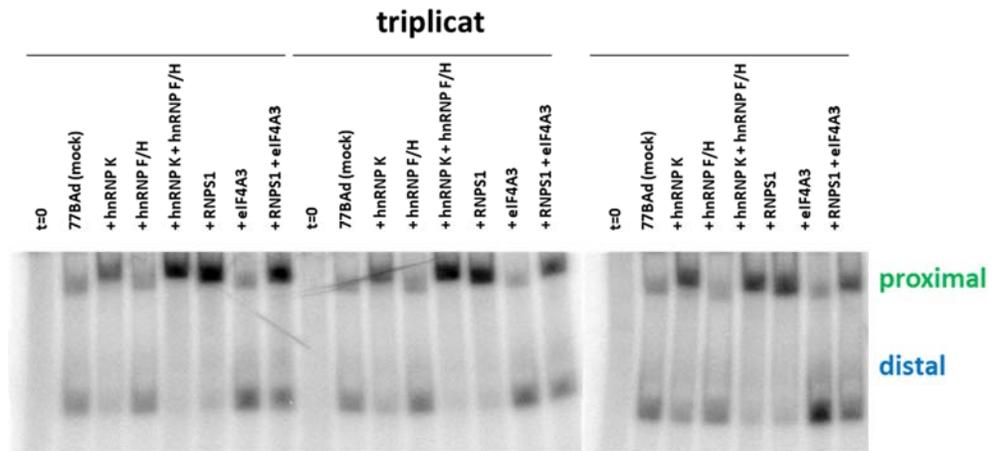
Nous avons commencé par des études *in vitro* (**Fig. 14**). Les ADN plasmidiques contenant la construction sont linéarisés et les transcrits sont synthétisés *in vitro*. Après incubation dans un extrait nucléaire, les variants produits sont amplifiés par RT-PCR et séparés sur gel d'acrylamide non dénaturant afin de quantifier la proportion relative de chacun des isoformes. Le pourcentage

d'utilisation de site 5' d'épissage proximal est calculé en mesurant le ratio d'utilisation du site d'épissage 5' proximal: isoforme long / (isoforme court + isoforme long)) x 100. Plus le site d'épissage 5' proximal sera utilisé, plus il y aura de produit proximal de longue taille. Nous comparons toujours par rapport au contrôle qui sert de référence.

L'épissage du transcrit contrôle donne un pourcentage d'utilisation de moins de 50% du site d'épissage 5' proximal (**Fig. 14.A, 14.B**). Ainsi, le site d'épissage 5' proximal est autant utilisé que le site d'épissage 5' distal puisque les deux isoformes distal et proximal sont présents en même quantité. L'ajout du site de liaison d'hnRNP K en amont du site 5' proximal augmente significativement l'utilisation du site proximal jusqu'à 85%, alors que l'ajout du site de liaison d'hnRNP F/H en aval n'a pas d'impact. La combinaison des deux insertions augmente significativement encore plus l'efficacité d'utilisation du site 5' proximal, avec un niveau supérieur à 90%.

L'ajout du site de liaison pour RNPS1 en amont accroît fortement l'utilisation du site 5' proximal à environ 90%, alors que l'ajout d'un site pour eIF43 diminue son utilisation jusqu'à 25%. La combinaison des deux sites de liaison pour RNPS1 et eIF4A3 augmente l'utilisation du site 5' proximal à 70% qui reste moins importante qu'avec le site RNPS1 seul. Ces résultats comparés avec le contrôle sont significatifs (**Fig. 14.B**).

A.



B.

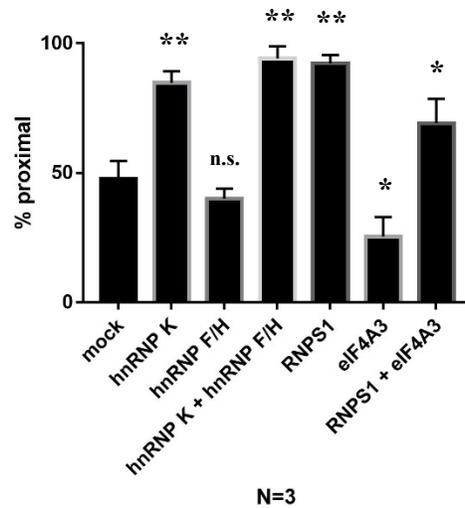


Figure 14: Épissage alternatif *in vitro* des constructions 77BAd contenant les différents éléments reconnus par eIF4A3, RNPS1, hnRNP K et hnRNP F/H. **A.** Visualisation des isoformes proximaux et distaux par RT-PCR. Les tailles des isoformes sont différentes à cause de l'insertion des séquences. t=0: temps 0 d'épissage. **B.** Pourcentage normalisé d'utilisation du site d'épissage 5' proximal d'après les transcrits visualisés en A (n=3). Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques représentent les valeurs P significatives, avec le test t de Student bilatéral, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles. *P < 0.05. **P < 0.01. n.s = non significatif.

Les différentes tailles des isoformes proximaux obtenus sur le gel sont dues à l'insertion des éléments. En effet, pour les transcrits contenant les sites de liaison de hnRNP K et RNPS1, les séquences ajoutées dans les exons et introns sont présentes dans les ARN pré-messagers et les

bandes sont donc plus hautes. Pour les isoformes distaux, les éléments insérés ne sont plus présents, et les tailles des bandes sont identiques à celles du contrôle.

Essais *in vivo*

Nous avons ensuite réalisé des essais d'épissage *in vivo* dans la lignée cellulaire HEK293 de rein (Fig. 15). Cette lignée cellulaire est utilisée couramment au laboratoire dans les études d'épissage, ce qui permet de comparer nos résultats à ceux d'études précédentes. Dans ce contexte, il est attendu que 77BAd soit épissé de manière efficace car la lignée cellulaire HEK293 contient tous les facteurs cellulaires nécessaires pour assurer les niveaux de régulation, comme le processus de co-transcription avec l'épissage. Les mêmes constructions, avec les mêmes insertions, ont été utilisées.

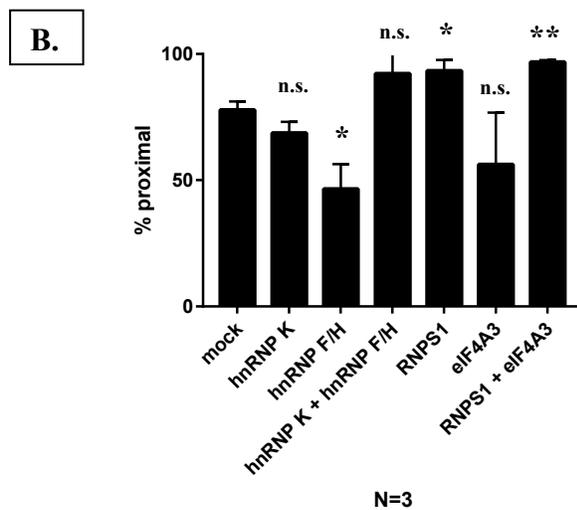
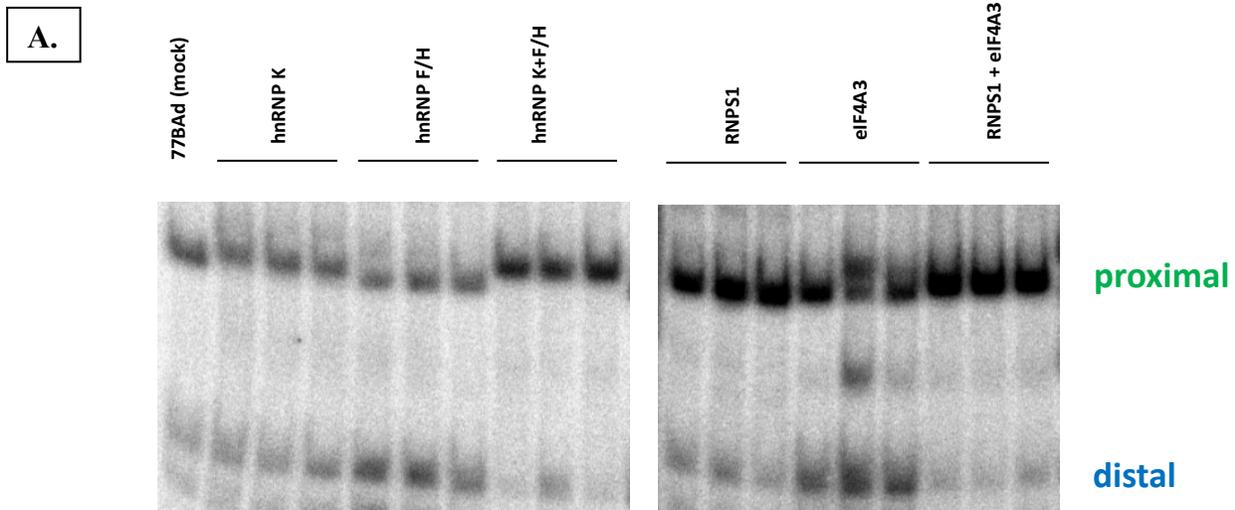


Figure 15: Épissage alternatif *in vivo* des constructions 77BAd contenant les différents éléments reconnus par eIF4A3, RNPS1, hnRNP K et hnRNP F/H. **A.** Visualisation des isoformes proximaux et distaux par RT-PCR. Les tailles des isoformes sont différentes à cause de l'insertion des séquences. **B.** Pourcentage normalisé d'utilisation du site d'épissage 5' proximal d'après les transcrits visualisés en A (n=3). Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques représentent les valeurs P, avec le test t de Student bilatéral, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles. *P <0.05; **P<0.01. n.s = non significatif.

Tout d'abord, nous observons que l'utilisation du site d'épissage 5' proximal est d'environ 80% pour la construction contrôle et que l'ajout d'un site de liaison pour hnRNP K ne change pas son utilisation (**Fig. 15.A, 15.B**). L'ajout du site de liaison hnRNP F/H diminue significativement l'utilisation du site 5' proximal jusqu'à 50%, alors que la combinaison des sites hnRNP K et hnRNP F/H ne donne pas d'effet. L'insertion du site de liaison pour RNPS1 augmente l'utilisation du site proximal à plus de 90% de manière significative, alors que celle d'eIF4A3 n'affecte pas l'utilisation du site. Pour la construction contenant les deux sites RNPS1 et eIF4A3, l'utilisation du site d'épissage proximal est encore plus forte qu'avec l'élément RNPS1, et atteint presque 100%.

La comparaison de nos résultats à ceux du laboratoire, dans lesquels les éléments ont été supprimés, révèle quelques différences. En effet, alors que l'absence des domaines de liaison pour hnRNP K et RNPS1 augmentaient l'utilisation du site xS, l'ajout de ces séquences, dans notre modèle, ne diminue pas l'utilisation du site. La délétion du site de liaison pour hnRNP F/H diminuait l'utilisation du site d'épissage, alors que l'ajout de ce site diminue l'utilisation du site d'épissage. Cependant, les résultats obtenus avec l'addition du site de liaison pour eIF4A3 concordent avec ceux obtenus par délétion, puisque la suppression de son site de fixation stimulait l'utilisation du site xS, alors que l'addition du site entraîne une répression de l'utilisation du site proximal.

Nos résultats montrent que le modèle que nous avons développé permet de visualiser *in vivo* et *in vitro* des changements d'épissage puisque les ajouts de séquences de liaison modulent l'épissage alternatif de 77BAd. En comparant les deux essais entre eux, nous pouvons noter une différence entre les deux contrôles au niveau de l'utilisation du site 5' proximal, moins de 50% et environ

80% pour les essais *in vitro* et *in vivo*, respectivement. L'efficacité d'utilisation du site d'épissage 5' proximal n'est pas la même dans les deux contextes.

Partie 2: Différences d'épissage entre les lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC en réponse aux dommages à l'ADN et à l'inhibition de la voie de signalisation PKC

Des études précédentes du laboratoire se sont intéressées à déterminer l'impact que certaines drogues ont sur l'épissage alternatif de *Bcl-x*. L'oxaliplatine et la staurosporine sont ainsi deux produits qui ont été utilisés pour induire des changements dans les interactions entre des facteurs d'épissage et l'ARNm. L'oxaliplatine, en alkylant l'ADN, crée des ponts entre deux guanines adjacentes, ce qui empêche la séparation des brins d'ADN et ainsi la réplication. La staurosporine est un inhibiteur de protéines kinases, notamment la PKC. Ces études ont montré que, dans la lignée cellulaire HEK293, les deux drogues changeaient de manière similaire le profil d'épissage alternatif de *Bcl-x*, avec un changement vers une majorité de *Bcl-xS*. Cependant, seul l'oxaliplatine conservait le même effet, soit une majorité de *Bcl-xS*, dans la lignée cancéreuse de côlon HCT116, contrairement à la staurosporine.

Par ailleurs, d'autres événements d'épissage différentiels en réponse à l'oxaliplatine ont été identifiés par analyse transcriptomique dans la lignée cellulaire HEK293, à partir d'une liste de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Shkreta et al., 2008). De cette liste, 57 événements d'épissage ont ainsi été choisis.

Nous avons donc voulu vérifier l'impact de dommages à l'ADN induits par l'oxaliplatine (100 μ M) ou de la répression de PKC par la staurosporine (60 nM) sur les événements d'épissage de *Bcl-xL* et d'autres gènes, dans différentes lignées cellulaires, soient la lignée HEK293, la lignée de carcinome de côlon humain HCT116, et la lignée normale intestinale épithéliale humaine HIEC.

Comparaison de l'effet de l'oxaliplatine et de la staurosporine sur les événements d'épissage dans la lignée cellulaire HEK293

Nous avons récupéré l'ensemble des données d'analyses, obtenu par RT-PCR sur des ARNm extraits de la lignée cellulaire HEK293 traitée ou non, avec l'oxaliplatine ou la staurosporine. Nous

avons identifié des événements d'épissage qui changent durant les traitements à l'oxaliplatine et/ou la staurosporine (**Fig. 16**). Les données sont calculées comme précédemment en quantifiant la proportion relative de chacun des isoformes. Les résultats sont présentés sous valeur de PSI (Percent Splicing Index), qui indique la quantité de l'isoforme long pour chacun des événements. Un seuil, jusqu'à une valeur minimum d'un Δ PSI égal à 5, a été choisi. Nous avons identifié, parmi les 57 événements, 16 événements d'épissage qui ne réagissent qu'à l'oxaliplatine, 4 événements qui ne réagissent qu'à la staurosporine et 12 qui réagissent aux deux.

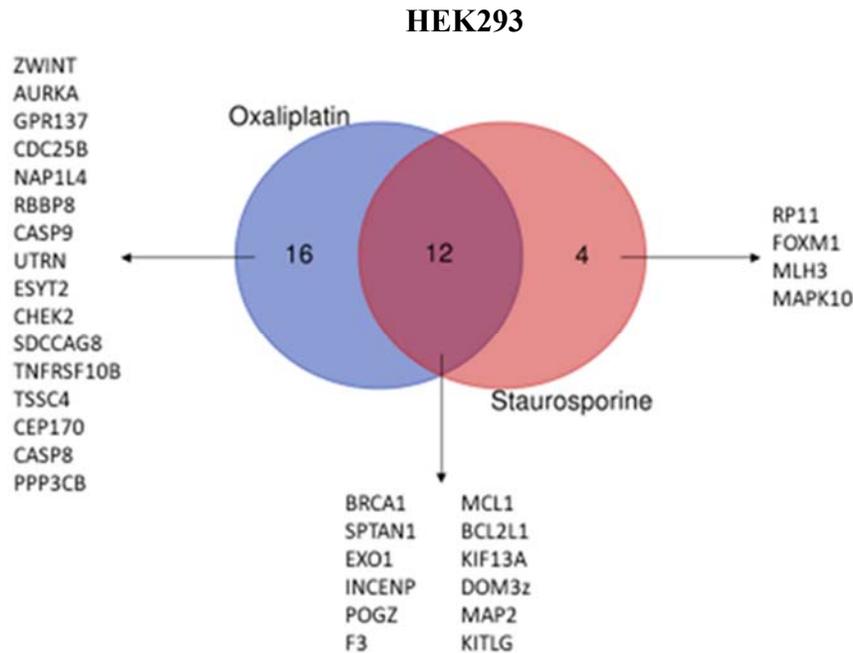


Figure 16: Diagramme de Venn montrant les événements d'épissage réagissant à l'oxaliplatine et/ou à la staurosporine dans la lignée cellulaire HEK293. 12 sont communs aux deux drogues. (Δ PSI: ≥ 5 ; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1).

Comparaison de l'effet de l'oxaliplatine et de la staurosporine sur des événements d'épissage dans les lignées cellulaires HCT116 et HIEC

Nous avons extrait les ARNm des cellules HIEC et HCT116 traitées avec l'oxaliplatine ou la staurosporine. Nous avons tout d'abord réalisé un test sur *Bcl-x* pour observer les changements produits (**Fig. 17**). Pour ces analyses, nous avons mesuré la quantité de *Bcl-xS* (isoforme court) au lieu de l'isoforme long. Ainsi pour les cellules HCT116, nous observons une quantité du variant

xS plus faible, à moins de 20% par rapport à xL, pour le contrôle (mock). Le traitement à l'oxaliplatin réduit cet écart puisque la quantité du variant xS augmente significativement à 40%. Le traitement à la staurosporine n'a pas d'effet. Pour les cellules HIEC, le niveau de xS pour le contrôle est d'environ 25% pour le contrôle, alors que l'ajout d'oxaliplatin augmente significativement xS à plus de 40%, au contraire de l'absence d'effet en réponse à la staurosporine. Nous constatons ainsi que l'oxaliplatin a un effet similaire sur l'augmentation de *Bcl-xS* dans les deux lignées même si elle est plus importante pour les cellules HCT116 (+25%) que pour les cellules HIEC (+15%). La staurosporine n'a quasiment pas d'effet sur les deux lignées. De manière intéressante, lors du traitement à l'oxaliplatin pour les cellules HCT116, nous remarquons que l'intensité xL diminue sur le gel et celle de xS augmente légèrement alors que pour les cellules HIEC, xL ne change pas et xS augmente beaucoup.

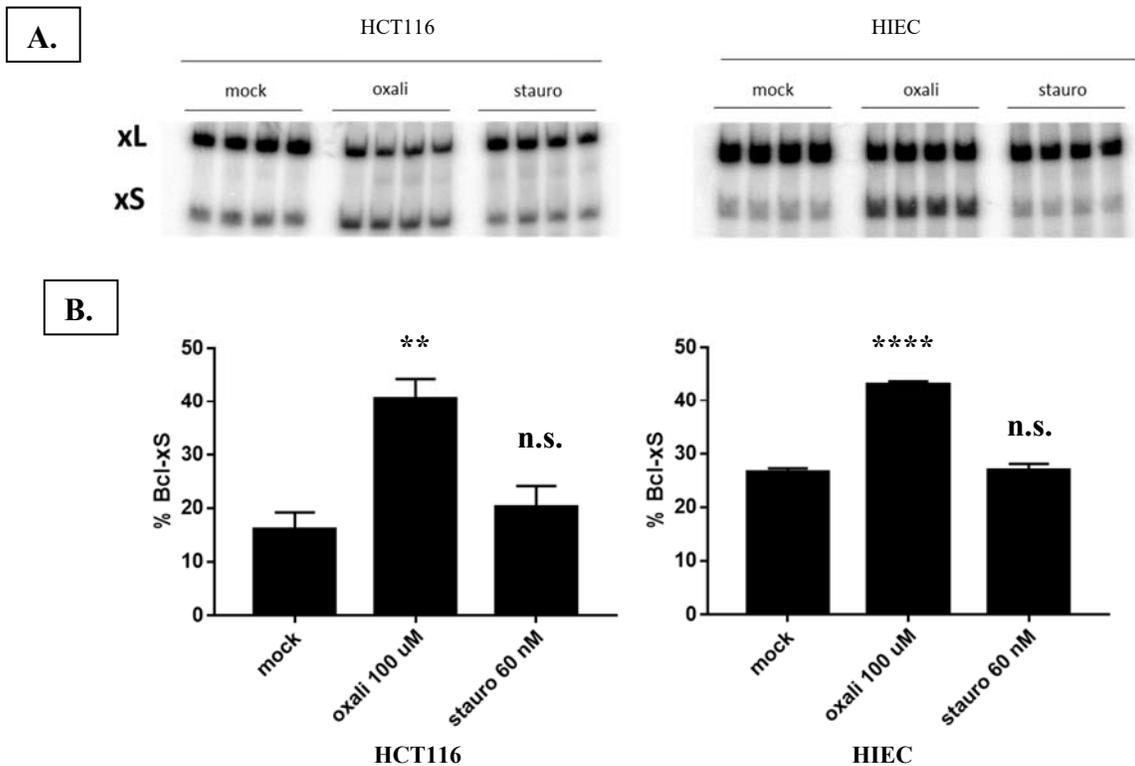


Figure 17: Épissage alternatif de *Bcl-x* *in vivo* dans les lignées cellulaires HCT116 et HIEC traitées à l'oxaliplatin ou à la staurosporine. **A.** Visualisation des isoformes xS et xL par RT-PCR. **B.** Pourcentage normalisé d'utilisation du site d'épissage xS (n=4). Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques représentent les valeurs P, avec le test t de Student bilatéral, en

comparant les moyennes entre les tests et les contrôles. **P<0.01; ****P<0.0001; n.s = non significatif.

La même méthode d'analyse par RT-PCR a permis d'obtenir des données d'analyse qui nous ont permis de comparer tous les événements par lignée entre les deux drogues (**Fig. 18**). Nous avons observé que les événements d'épissage affectés par les deux drogues dans les deux lignées ne sont pas les mêmes, par exemple *INCENP* et *PPP3CB* pour les cellules HCT116, ou *CASC4* et *AKIP1* pour les cellules HIEC.

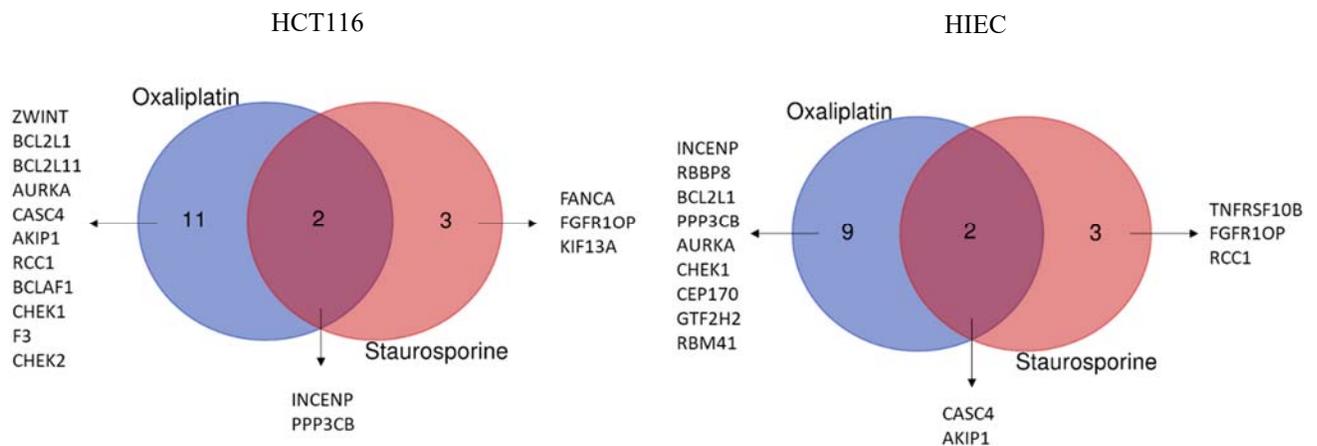


Figure 18: Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage différentiels en réponse à l'oxaliplatine et/ou à la staurosporine dans les lignées cellulaires HCT116 et HIEC. Aucun événement n'apparaît en commun parmi ceux qui réagissent aux deux drogues dans les deux lignées. (Δ PSI: ≥ 5 ; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1).

Nous avons fait ensuite un recouplement des données pour chaque drogue entre les trois lignées, pour identifier des événements communs (**Fig. 19**). Quatre événements d'épissage communs résultant du traitement à l'oxaliplatine, et affectant les gènes *ARKA*, *INCENP*, *BCL2L1* (ou *Bcl-x*) et *PPP3CB*, ont été identifiés.

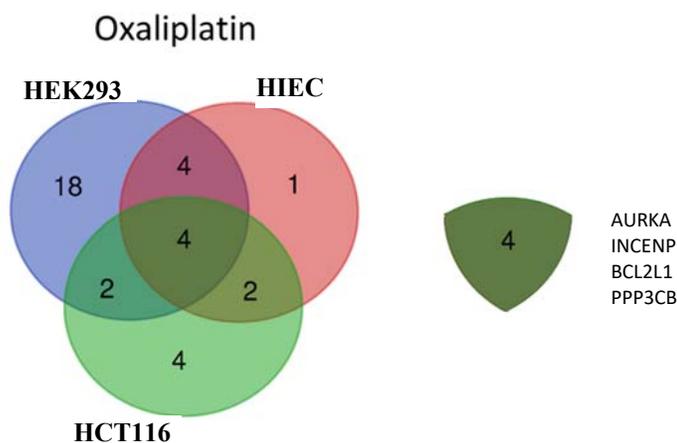


Figure 19: Diagramme de Venn montrant les événements d'épissage différentiels en réponse à l'oxaliplatine dans les lignées cellulaires HEK293, HIEC et HCT116. Quatre événements sont communs aux trois lignées: *ARKA*, *INCENP*, *BCL2L1* (ou *Bcl-x*) et *PPP3CB*. ($\Delta\text{PSI} \geq 5$; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1).

En se penchant sur les 4 événements, nous avons voulu comparer le type d'effet que l'oxaliplatine provoque dans les trois lignées (**Fig. 20**).

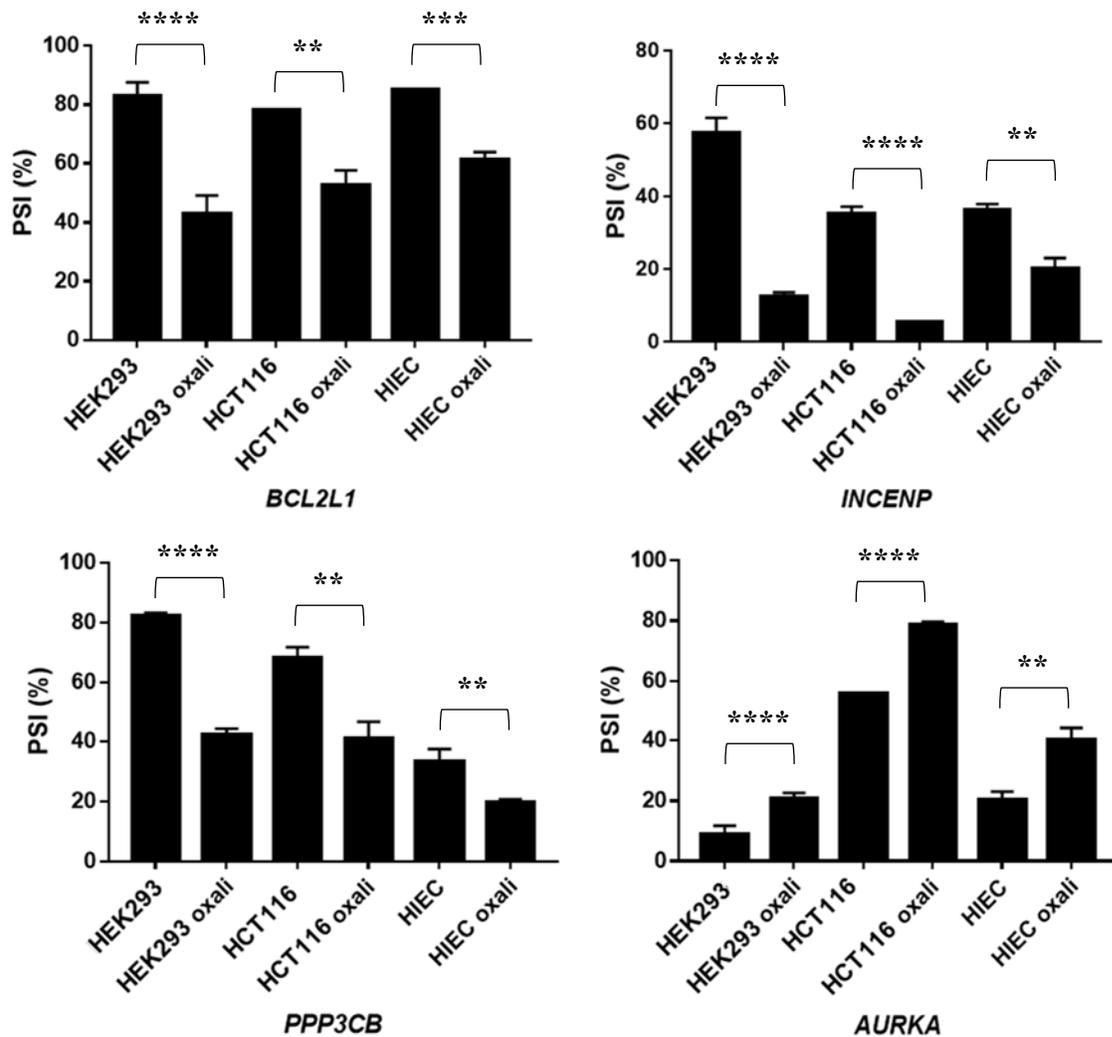


Figure 20: Impact de l'oxaliplatin sur des événements d'épissage dans les trois lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques représentent les valeurs P, avec le test t de Student bilatéral, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles. **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. (Δ PSI: ≥ 5 ; P<0.05; Tableau Supplémentaire S1).

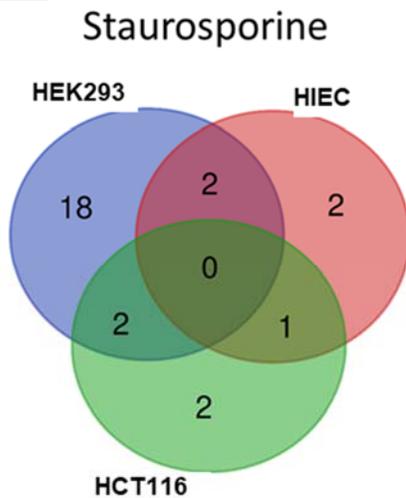
Pour les 4 gènes, l'oxaliplatin induit, pour chacune des trois lignées, les mêmes conséquences dans la même direction. Cependant, l'amplitude de l'effet est différente. Pour l'événement du gène *BCL2L1*, l'oxaliplatin réduit le PSI de 20% à 40% par rapport aux conditions sans traitement pour toutes les lignées. Pour ce gène, cette valeur représente l'isoforme *Bcl-xL*. Ainsi nous retrouvons

les tendances observées auparavant pour les lignées cellulaires HIEC et HCT116 (**Fig. 17**), c'est-à-dire l'isoforme *Bcl-xS* à environ 20% dans les contrôles HCT116 et HIEC et puis à 40% lors des traitements à l'oxaliplatine.

Pour l'événement du gène *INCENP*, les PSI des contrôles sans traitement sont différents entre les lignées. Alors que dans les cellules HEK293, le traitement à l'oxaliplatine réduit le PSI de plus de 45%, les diminutions du PSI vont du simple au double, soient de 5% à 20% respectivement, dans les cellules HCT116 et les cellules HIEC. Pour l'événement du gène *PPP3CB*, les niveaux du PSI des contrôles sans traitement sont aussi différents entre les lignées. Le traitement à l'oxaliplatine réduit de près de 50% le PSI pour chaque lignée. Finalement, pour le gène *AURKA*, les niveaux de base du PSI sont aussi différents entre les lignées, ainsi que l'amplitude des effets en réponse à l'oxaliplatine. En effet, pour les cellules HEK293, le PSI augmente de 10% à 20%, pour les cellules HCT116, d'environ 60% à 80%, et pour les cellules HIEC, de 20% à 40%.

Contrairement au traitement à l'oxaliplatine, aucun événement d'épissage commun n'a été identifié entre les lignées cellulaires à la suite d'un traitement à la staurosporine (**Fig. 21**). Pour le gène *BCL2L1*, seul un traitement à la staurosporine des cellules HEK293 mène à une différence d'épissage. Un grand nombre d'événements d'épissage varie donc d'une lignée à l'autre.

A.



B.

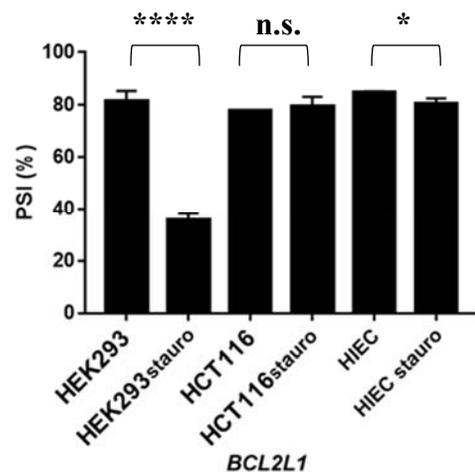


Figure 21: **A.** Diagramme de Venn montrant les événements d'épissage différentiel en réponse à la staurosporine dans les lignées cellulaires HEK293, HIEC et HCT116. Aucun événement commun n'a été identifié entre les trois lignées. (Δ PSI: ≥ 5 ; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1). **B.** L'exemple du gène *BCL2L1* (*Bcl-x*). Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques représentent les valeurs P, avec le test t de Student bilatéral, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles. * $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$; n.s = non significatif.

Nous avons ensuite identifié les événements d'épissage qui pourraient être communs à deux lignées, en réponse à une drogue, ou commun à une lignée, en réponse à deux drogues.

Nous n'avons d'abord observé aucun événement d'épissage différentiel commun entre les cellules HEK293 et HIEC en réponse aux deux drogues (**Fig. 22**). Cependant, l'épissage des gènes *INCENP* et *GTF2H2* est affecté par l'oxaliplatine dans les deux lignées et seulement par la staurosporine dans les cellules HEK293, alors que l'épissage du gène *TNFRSF10B* est affecté par la staurosporine dans les deux lignées et seulement par l'oxaliplatine dans les cellules HEK293.

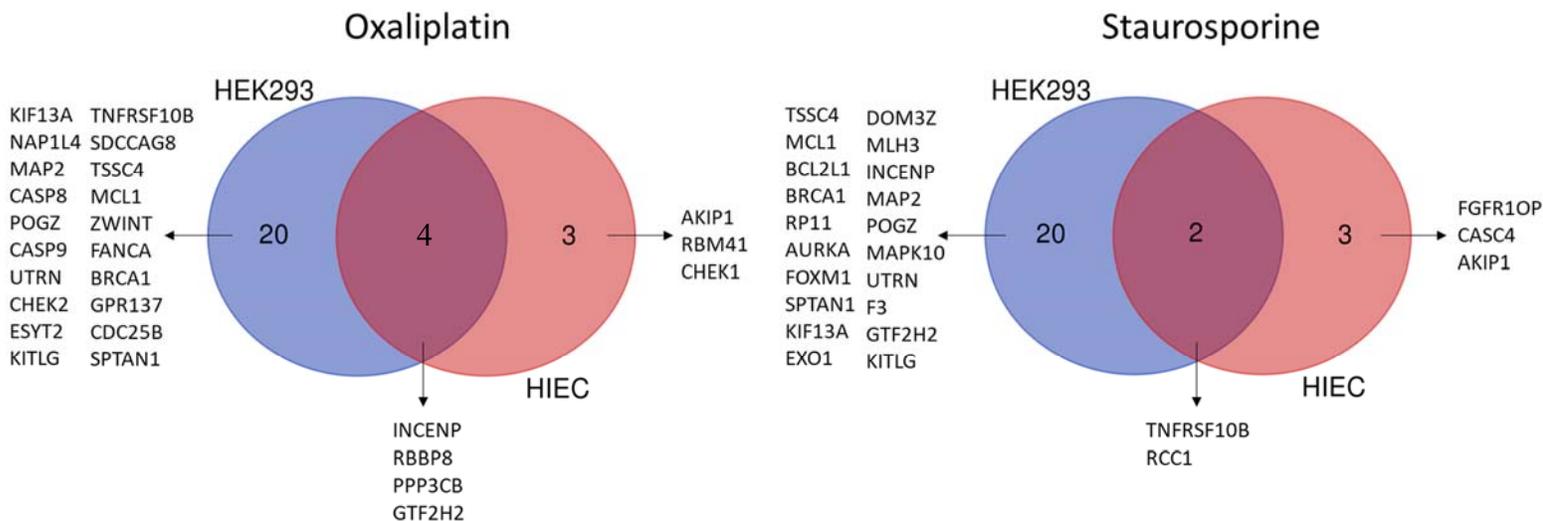


Figure 22: Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage communs en réponse à l'oxaliplatine ou à la staurosporine entre les lignées cellulaires HEK293 et HIEC. (Δ PSI: ≥ 5 ; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1).

Ensuite, nous avons comparé les résultats de deux lignées intestinales épithéliales, soient les lignées HIEC et HTC116 (**Fig. 23**). Aucun événement différentiel commun en réponse aux deux drogues n'a été observé dans les deux lignées. Par exemple, l'épissage du gène *AKIP1* est affecté par l'oxaliplatin dans les deux lignées, mais seulement dans les cellules HIEC par la staurosporine. De même, l'épissage des gènes *INCENP* et *PPP3CB* est aussi affecté par l'oxaliplatin dans les deux lignées, mais seulement par la staurosporine dans les cellules HCT116.

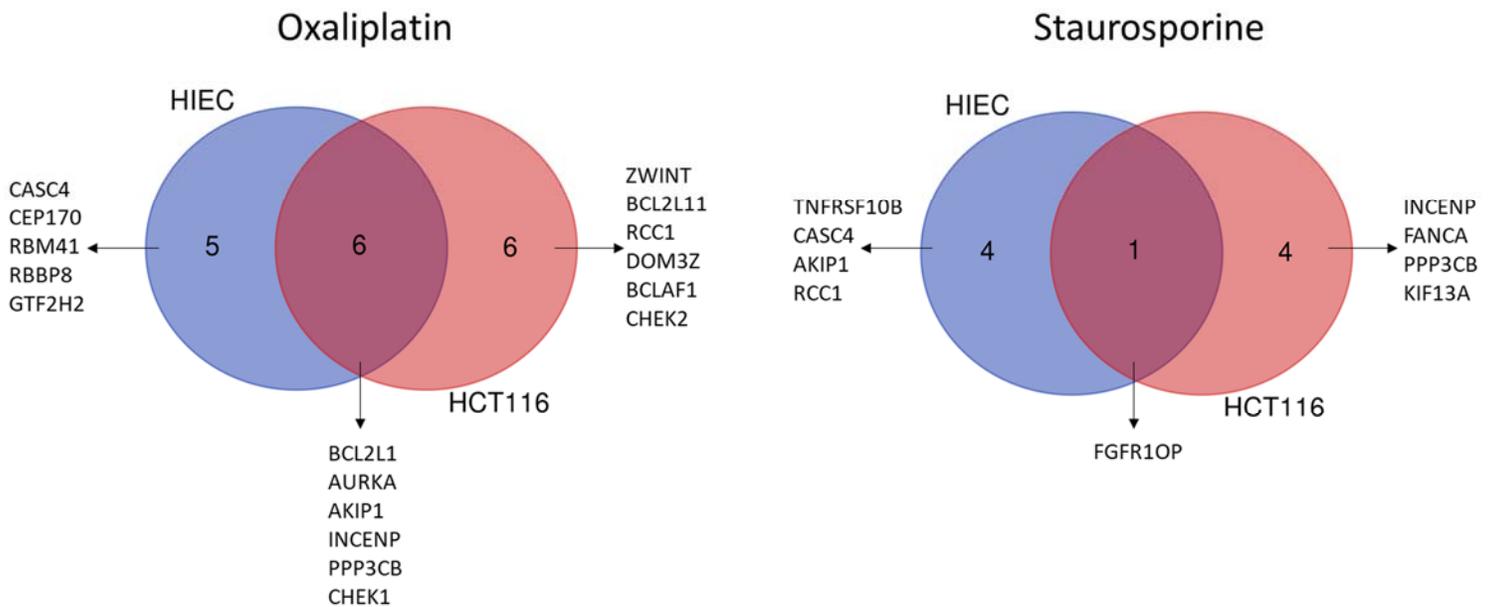


Figure 23: Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage communs en réponse à l'oxaliplatin ou à la staurosporine entre les lignées cellulaires HCT116 et HIEC. (Δ PSI: ≥ 5 ; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1).

Finalement, nous avons comparé les lignées HEK293 et HCT116 analysées auparavant au laboratoire (**Fig. 24**). Nous avons observé que le gène *INCENP* a subi le seul événement d'épissage commun induit en réponse aux deux drogues dans les deux lignées. L'épissage du gène *BCL2L1* est, comme attendu, affecté par l'oxaliplatin dans les deux lignées mais seulement par la staurosporine dans les cellules HEK293. L'épissage du gène *AURKA* est modifié par le traitement à l'oxaliplatin dans les deux lignées, mais seulement par la staurosporine dans les cellules

HEK293, alors qu'à l'inverse, l'épissage du gène *PPP3CB* est modifié par l'oxaliplatin dans les deux lignées, mais uniquement dans les cellules HCT116 pour la staurosporine.

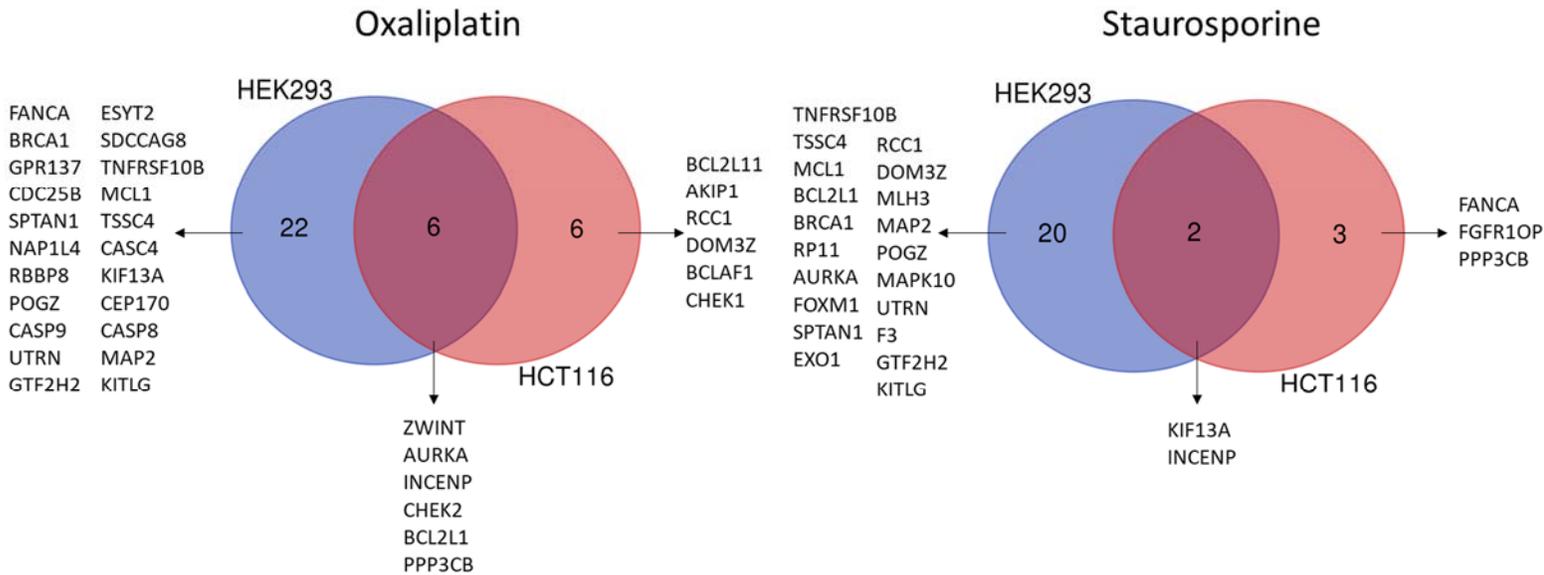


Figure 24: Diagrammes de Venn montrant les événements d'épissage communs en réponse à l'oxaliplatin ou à la staurosporine entre les lignées cellulaires HCT116 et HEK293. ($\Delta\text{PSI} \geq 5$; $P < 0.05$, test t de Student bilatéral; Tableau Supplémentaire S1).

Partie 3: Remodelage de la chromatine et épissage alternatif

Nous avons ensuite vérifié le rôle du remodelage de la chromatine résultant de modifications post-traductionnelles des histones dans la régulation de l'épissage alternatif en réponse à des dommages à l'ADN, dans nos lignées cellulaires. En effet, ces modifications affectent la régulation de la transcription et l'épissage.

Nous avons utilisé des composés fournis par le *Structural Genomics Consortium* (Toronto), et qui peuvent altérer la structure de la chromatine en inhibant la liaison de protéines contenant des bromodomains aux lysines acétylées (13 composés: GSK8814, BAY-850, BAZ2801, BAZ2-ICR, BI-9564, NI-57, GSK6853, BAY-299, SGCCBP30, ICBP112, NVS-CECR2-1, PFI-3 et

JQ1), ou en inhibant l'activité des arginines dihydrolases qui catalysent le changement d'une arginine en citrulline (GSK484). Dans les deux cas, ces molécules peuvent affecter des modifications post-traductionnelles des histones, et/ou des interactions avec d'autres facteurs, changeant ainsi l'état de compaction de la chromatine.

Les composés doivent être dilués dans du DMSO. Un premier test est réalisé avec du DMSO dans les conditions contrôles et avec un traitement à l'oxaliplatin pour vérifier si le DMSO affecte ou non ces conditions. Nous avons donc traité ou non les cellules HEK293 à l'oxaliplatin, avec ou sans les composés, et en présence de DMSO, en utilisant *Bcl-x* comme contrôle (**Fig. 25**). En premier, nous constatons que le DMSO n'affecte ni le contrôle, ni les effets de l'oxaliplatin. Pour la suite des résultats, le DMSO sera toujours présent. De plus, nous avons observé qu'un premier test avec le composé BI-9564, qui lie des bromodomains, n'affecte pas significativement la quantité de *Bcl-xS* produite de base (20%) ou en réponse à l'oxaliplatin (60%).

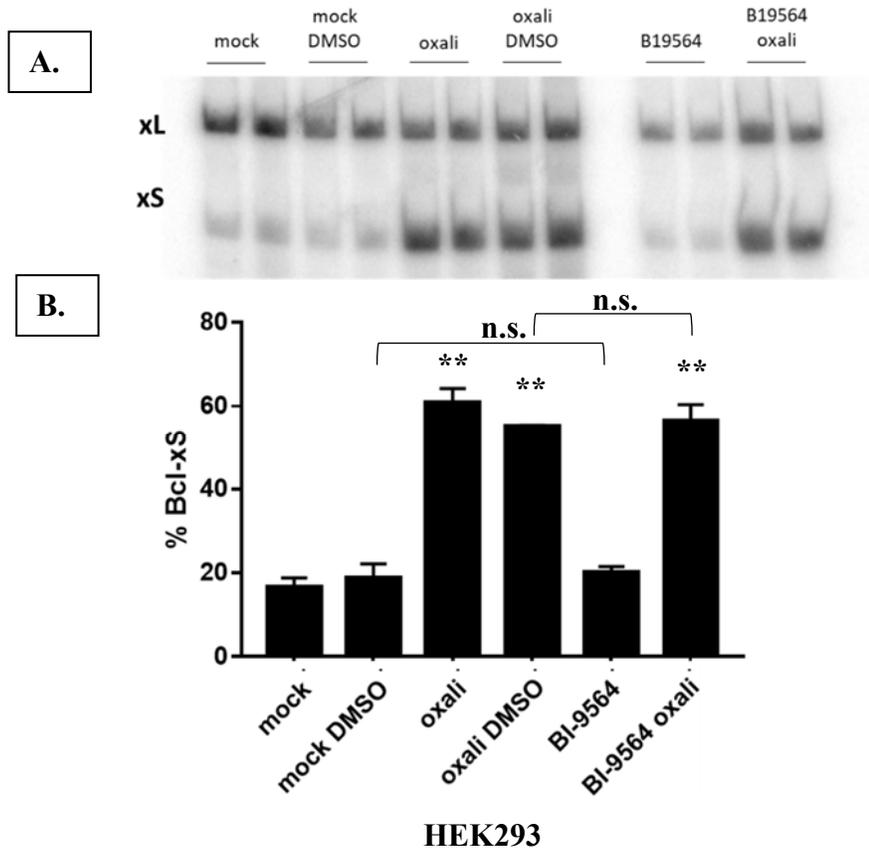


Figure 25: Épissage alternatif de *Bcl-x* *in vivo* dans la lignée cellulaire HEK293 après un traitement à l'oxaliplatine ou avec le composé BI-9564. **A.** Visualisation des isoformes xS et xL par RT-PCR. **B.** Pourcentage normalisé d'utilisation du site d'épissage xS (n=2). Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques représentent les valeurs P significatives, avec le test t de Student bilatéral, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles. **P<0.01. n.s = non significatif.

D'autres composés ont des effets différents sur des gènes variés (**Fig. 26, 27**). Alors que le traitement à l'oxaliplatine diminue le PSI de l'événement du gène *KIF13A* jusqu'à 10%, en comparaison au PSI contrôle de 60%, les composés GSK8814 et BAZ2-ICR restaurent partiellement (GSK8814, PSI de 20%; BAZ2-ICR, PSI de 40%) les niveaux d'épissage (**Fig. 26**). De même, alors que l'événement d'épissage du gène *CASP9* a un PSI de 15% dans le contrôle et que le traitement à l'oxaliplatine augmente le PSI à 40%, le composé SGCCBP30 neutralise partiellement (PSI de 25%). Il est à noter que les produits seuls ont peu d'impact sur les événements d'épissage de base (**Fig. 26**).

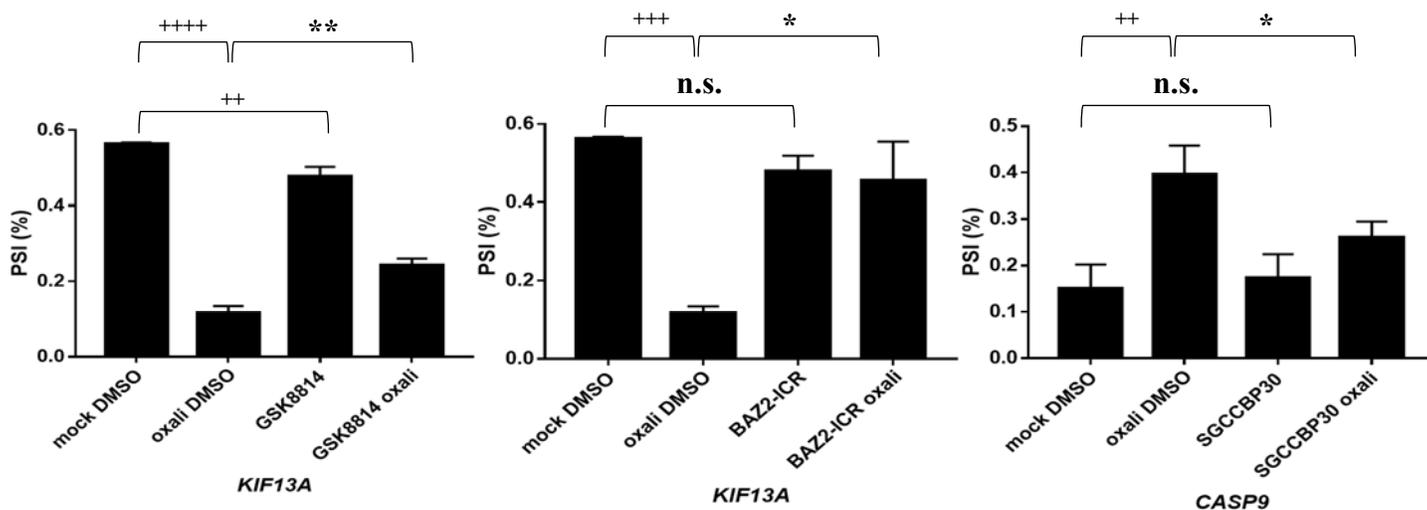


Figure 26: Effet des composés GSK8814, BAZ2-ICR et SGCCBP30 sur les événements d'épissage des gènes *KIF13A* et *CASP9* modifiés à la suite d'un traitement des cellules HEK293 par l'oxaliplatine. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques et les « plus » représentent les valeurs P significatives, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles, avec le test t de Student bilatéral ou l'analyse de la variance à un facteur avec comparaison multiple test de Dunnett. $^{*/+}P < 0.05$, $^{**/+}P < 0.01$, $^{***/+}P < 0.001$, $^{****/+}P < 0.0001$; n.s. = non significatif. (Δ PSI: ≥ 10 ; $P < 0.05$; Tableau Supplémentaire S2).

Des effets différents sont observés avec d'autres composés (**Fig. 27**). Alors que l'oxaliplatine double le PSI du gène *KITLG* (20% dans le contrôle, à plus de 40%), l'addition de JQ1 augmente le PSI contrôle à environ 35%, et induit une augmentation encore plus importante du PSI jusqu'à près de 60%, en présence d'oxaliplatine. Alors que l'oxaliplatine diminue peu l'événement du gène *ZWINT* (PSI près de 60%), l'addition du composé JQ1 à des cellules traitées à l'oxaliplatine réduit le PSI de moitié, jusqu'à 30%. Finalement, le niveau de PSI du gène *TSSC4* dans le contrôle est de près de 80% et l'addition d'oxaliplatine le diminue de moitié pour atteindre environ 40%. Alors que le composé BAY-850 n'a pas d'effet sur le PSI de base, il diminue davantage le PSI en présence d'oxaliplatine, jusqu'à atteindre 30%.

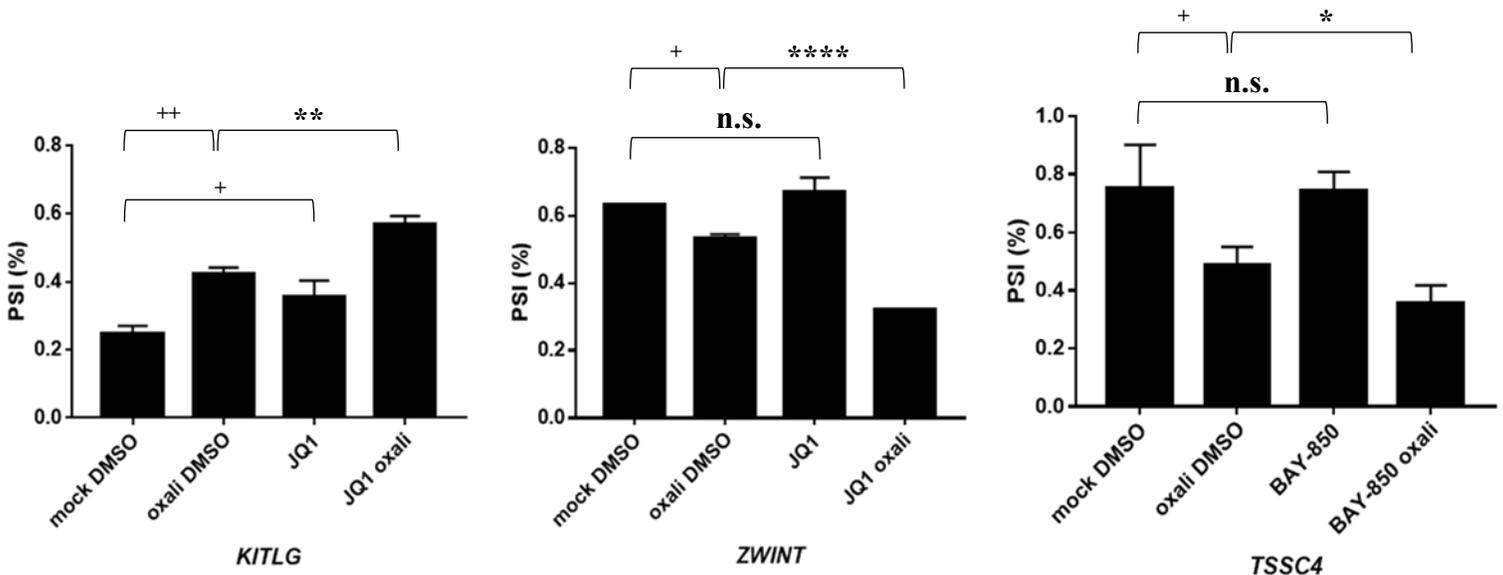


Figure 27: Effet des composés JQ1 et BAY-850 sur les événements d'épissage des gènes *KITLG*, *ZWINT* et *TSSC4* modifiés à la suite à un traitement des cellules HEK293 par l'oxaliplatine. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type. Les astérisques et les « plus » représentent les valeurs P significatives, en comparant les moyennes entre les tests et les contrôles, avec le test t de Student bilatéral ou l'analyse de la variance à un facteur avec comparaison multiple test de Dunnett. */+P<0.05, **/+P<0.01, ***/+++P <0.0001; n.s. = non significatif. (Δ PSI: ≥ 10 ; P<0.05; Tableau Supplémentaire S2).

Discussion

Pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif, nous avons entrepris trois approches durant ma maîtrise. La première pour déterminer comment des éléments peuvent agir en combinaison pour réguler l'épissage alternatif du gène *Bcl-x*. La deuxième pour analyser les modulations d'événements d'épissage alternatif, dont *Bcl-x*, dans différentes lignées cellulaires et à la suite de stress. Finalement, la troisième pour observer l'impact de l'état de la chromatine, en lien également avec des dommages à l'ADN, sur l'épissage alternatif des mêmes événements d'épissage.

Partie 1: Explorer la mécanique combinatoire d'éléments régulateurs de l'épissage alternatif de *Bcl-x*

L'épissage alternatif est régulé par des éléments activateurs ou inhibiteurs sur lesquels vont se lier des protéines de liaison à l'ARN. Celles-ci vont avoir un rôle positif ou négatif selon leur site de fixation et peuvent également se combiner pour avoir des effets antagonistes, synergiques ou collaboratifs. Les études précédentes du laboratoire sur la régulation de l'épissage alternatif du gène *Bcl-x* ont permis de dévoiler certains des éléments régulateurs impliqués dans la sélection des sites d'épissage xS et xL. Pour disséquer les interactions entre ces modulateurs et ainsi affiner leur mécanisme d'action, nous avons utilisé un ARN pré-messager, 77BAd, dans lequel nous avons inséré des sites de liaison potentiels pour deux couples de facteur: hnRNP K/hnRNP F/H et RNSP1/eIF4A3. Dans un contexte normal de croissance, sur des pré-ARNm différents, hnRNP K est un répresseur et, plus minoritairement, hnRNP F/H est un stimulateur de *Bcl-xS* avec l'aide de SRSF10. À la suite de dommages à l'ADN, SRSF10 interagit avec hnRNP K permettant l'accès à hnRNP F/H (Shkreta et al., 2016). Les facteurs eIF4A3 et RNSP1 répriment également *Bcl-xS* (Michelle et al., 2012) ; Le premier fait partie de l'Exon Junction Complex (EJC) et le deuxième est un facteur associé à l'EJC et forme avec les facteurs ACINUS et PININ le complexe ASAP (Schwerk et al., 2003). L'hypothèse du laboratoire est que les combinaisons hnRNP K/hnRNP F/H et EJC/ASAP répriment *Bcl-xS* quand elles sont combinées, annulant l'effet minoritaire stimulateur de hnRNP F/H. Nous avons reconstruit ces architectures de sites régulateurs dans un modèle simple en ajoutant un à un les sites de liaison pour tester le modèle combinatoire entre

deux facteurs. Les tests *in vitro* et *in vivo* effectués dans des cellules HEK293 ont montré que ce système répond au contrôle individuel, puisque l'ajout des séquences de liaison pour chacune des quatre protéines module l'épissage alternatif de 77BAD, et de façon différente pour chaque élément. Cependant, entre les essais *in vitro* et *in vivo*, il y a des différences pour les mêmes insertions (**Fig. 14, 15**). Ces variations peuvent s'expliquer par le type d'essai. En effet, dans l'essai *in vitro*, le couplage entre la transcription et l'épissage n'a pas eu lieu. Des facteurs d'épissage recrutés via l'ARN polymérase II sont moins, ou plus du tout, présent ce qui induit que des sites d'épissages n'ont pas été utilisés avec la même fréquence. De plus, ces facteurs auraient pu aussi affecter la transcription en régulant l'état de la chromatine par la méthylation d'histones (de Almeida S.F. et al., 2011). Ainsi, l'épissage alternatif de 77BAD dans les contrôles, ne contenant aucun régulateur ajouté, est déjà différent entre les deux essais. *In vitro*, il y a 50% de chacun des isoformes alors qu'*in vivo*, l'isoforme long est présent à 80% (**Fig. 14.B, 15.B**). Les ajouts des sites ont également induit des régulations différentes de l'épissage alternatif entre essais avec les mêmes ajouts. Ainsi, l'ajout du site de liaison pour hnRNP K n'a un effet positif que dans l'essai *in vitro* alors que le site de liaison pour hnRNP F/H a un effet négatif seulement *in vivo*. Dans aucun des cas, les effets de répression de hnRNP K et de stimulation de hnRNP F/H observés dans *Bcl-x* ne sont constatés. Le site de liaison pour eIF4A3 n'a d'effet qu'*in vitro* et il n'y a que l'ajout du site de liaison pour RNPS1 qui a un impact positif dans les deux essais.

Quand nous regardons les constructions combinant deux sites de liaison, des variations sont visibles. *In vitro*, la construction hnRNP K + hnRNP F/H, donne un pourcentage de proximal plus important qu'avec le site de liaison pour hnRNP K (**Fig. 14.B**). Alors qu'il n'avait pas d'effet seul, le site pour hnRNP F/H combiné avec le site pour hnRNP K augmente l'effet d'utilisation du site 5' proximal. Pour la construction RNPS1 + eIF4A3, le pourcentage de proximal est entre les deux constructions contenant les sites de liaison seuls. Ainsi, il apparaît que le site pour eIF4A3 atténue l'effet du site de liaison pour RNPS1, en déstabilisant peut-être son interaction avec le site. *In vivo*, la construction hnRNP K + hnRNP F/H ne donne pas d'effet mais la combinaison des sites annule l'effet du site hnRNP F/H seul (**Fig. 15.B**). Pour la construction RNPS1 + eIF4A3, le pourcentage du proximal est similaire à celui de la construction contenant le site RNPS1 seul. L'ajout du site de liaison pour eIF4A3 n'a rien changé à la différence de l'essai *in vitro*.

Maintenant, en comparant les résultats des constructions contenant un site de liaison avec ceux obtenus au laboratoire, et en supprimant ces mêmes protéines d'intérêt et leur site de liaison dans

Bcl-x, nous constatons des différences (**Tableau 2**). En effet, l'absence des domaines de liaison pour hnRNP K (Revil et al., 2009) et RNPS1 (Michelle et al., 2012) augmentait l'utilisation du site xS (site distal). Dans notre modèle 77BAd, l'ajout de ces séquences ne diminue pas l'utilisation du site d'épissage 5' proximal. La délétion du site de liaison pour hnRNP F/H (Garneau et al., 2005) diminuait l'utilisation du site d'épissage de xL (proximal), alors que l'ajout de ce site diminue l'utilisation du site d'épissage proximal. Néanmoins, les résultats obtenus avec l'addition du site de liaison pour eIF4A3 (Michelle et al., 2012) concordent puisque la suppression de son site de fixation stimulait l'utilisation du site xS (distal) et que l'addition du site, en aval du site proximal dans 77BAd, entraîne la répression de son utilisation. Ces différences peuvent s'expliquer par les différences entre 77BAd et *Bcl-x*. Les éléments insérés ne vont pas être dans le même contexte de régulation où il va manquer tous les autres éléments présents dans *Bcl-x*. Aussi, 77BAd peut posséder d'autres sites de liaison inconnus pour d'autres protéines qui peuvent interférer avec celles étudiées. Ainsi, les séquences insérées peuvent avoir été placées sur des sites de liaison pour des facteurs qui régulent l'épissage dans le contrôle. Pour RNPS1, la séquence ajoutée à une distance différente peut expliquer cet effet tout en révélant une autre régulation qui se fait peut-être sur le site d'épissage 5' distal.

	<i>Bcl-x</i>	77BAd <i>in vitro</i>	77BAd <i>in vivo</i>
hnRNP K	répresseur	activateur	n.s.
hnRNP F/H	activateur	n.s.	répresseur
hnRNP K + hnRNP F/H	répresseur	activateur	n.s.
RNPS1	répresseur	activateur	activateur
eIF4A3	répresseur	répresseur	n.s.
eIF4A3 + RNPS1	répresseur	activateur	activateur

Tableau 2 : Récapitulatif des effets préliminaires observées des facteurs d'épissage sur le site d'épissage xS sur le gène *Bcl-x* et sur le site d'épissage 5' proximal du minigène 77BAD dans un contexte d'épissage *in vitro* ou *in vivo*. n.s. : non significatif.

Les expériences réalisées dans cette approche n'ont pas permis de retrouver les observations des études précédentes sur les effets des facteurs ni de valider les hypothèses de mécanique combinatoire entre éléments permettant de réprimer un site d'épissage. Néanmoins, elles nous

apportent de nouvelles informations sur les deux couples. RNPS1 semble avoir un rôle important puisque sa séquence, seule ou combinée, a toujours un impact sur l'épissage même s'il ne va pas dans le sens de répression attendu. Cet impact est tout de même réduit, *in vitro*, par le site de liaison d'eIF4A3, qui est l'unique site qui concorde avec les données précédentes en réprimant l'épissage au site 5' proximal dans 77BAd. Il est à noter que bien que le site de liaison pour eIF4A3 ne soit pas bien défini, nous avons mis en évidence un site qui a un effet. Pour hnRNP K+hnRNP F/H, il n'y a que l'expérience *in vitro* où la combinaison de sites permet d'imaginer un lien entre les protéines. Néanmoins, l'effet observé ne va pas dans le sens attendu et d'autres facteurs doivent jouer un rôle, expliquant que les sites pour hnRNP K et pour hnRNP F/H n'ont des effets que dans les essais *in vitro* ou *in vivo*, respectivement.

Avec cette méthode, nous avons ajouté deux éléments différents dans un ARN pré-messager. Ce système est simple et comporte les contraintes que nous avons observées, c'est-à-dire plus petit, ayant des introns plus courts que ceux de *Bcl-x*, et ne contenant pas tous les éléments régulateurs du gène *Bcl-x*. La tentative de reconstruction de la régulation combinatoire n'a pas permis de répondre à nos hypothèses sur les observations actuelles entre les couples de facteurs hnRNP K/hnRNP F/H et EJC/ASAP (Cloutier et al. 2018) mais a permis de montrer que ces constructions sont réalisables. Nos résultats montrent que le modèle que nous avons développé permet de visualiser *in vivo* et *in vitro* des changements d'épissage: néanmoins, il faudrait affiner son utilisation. Les effets opposés observés pourraient s'expliquer par l'absence d'autres facteurs nécessaires dans *Bcl-x*. Il serait ainsi utile de les tester et de les combiner avec les sites de liaison déjà testés. Il faudrait tester d'autres séquences de liaison pour les protéines. Ces dernières avaient été sélectionnées dans les résultats précédents du laboratoire mais il faudrait tester d'autres séquences plus grandes qui pourraient englober des éléments nécessaires à d'autres protéines intervenant avec celle que l'on étudie. Par ailleurs, des travaux récents ont montré que le nombre de sites de liaison pour les protéines est plus faible que prévu et que des répétitions de quelques bases peuvent suffire. Ainsi, si le site de liaison n'est pas important, il a été noté l'importance de la structure secondaire de l'ARN et du contexte autour de ce site de liaison (Dominguez et al., 2010). Il faudra confirmer que les protéines attendues sont bien associées à tous les éléments insérés. Des immunoprécipitations pourront être réalisées pour le vérifier avec l'ARN 77BAd et/ou les protéines d'intérêt étiquetées. L'ajout de sites de liaison devrait permettre l'augmentation de la quantité des protéines d'intérêt. Des déplétions de protéines par interférence à l'ARN (siRNA)

pourraient être faites afin de confirmer leurs implications et ainsi que des mutations des séquences insérées pour affiner les séquences de reconnaissance pour la fixation des protéines. Il serait également intéressant de regarder la structure. En effet, pour 77BAd, celle-ci ne va pas être la même. Donc les éléments insérés ne vont pas agir de la même manière. Habituellement, les éléments régulateurs sont proches de ce qu'ils régulent mais il arrive qu'ils soient situés plus loin. Des facteurs présents dans *Bcl-x* à des distances plus grandes peuvent ainsi être absents. Pour prolonger l'exploration, des traitements avec des drogues tels que l'oxaliplatine, qui influencent les interactions entre ces protéines, pourront être utilisés pour déterminer si l'épissage alternatif change dans les constructions contenant les doubles insertions de site de liaison (Cloutier et al., 2018).

Finalement, le but serait d'adresser de manière systématique cette approche pour d'autres facteurs et de documenter les effets de collaboration entre eux. Cette démarche permettra d'apporter des réponses sur le combinatoire dans l'épissage. De plus, cela pourra être mené dans d'autres lignées cellulaires lorsqu'un autre régulateur ou un composé est ajouté. Cela permettra d'établir une banque de données sur les effets individuels et le changement de ces derniers dans ces différentes conditions. Ainsi individuellement, nous pourrions connaître les facteurs qui ont un effet négatif ou positif sur l'utilisation d'un site d'épissage, tout en ayant une idée de l'amplitude de leur impact. Une hiérarchie pourrait être ainsi faite entre les éléments selon l'ordre dans lequel ils font leur effet. Les sites de liaison ainsi identifiés pourront aussi être utilisés pour moduler l'épissage alternatif dans d'autres gènes en les ajoutant à l'aide d'oligonucléotides autour du site d'épissage (Brosseau et al., 2014). Ce type d'étude a déjà été mené et a permis de montrer l'impact d'ajout de séquences introniques se combinant ensemble pour permettre la définition d'un exon (Shengdong et Chasin, 2010) et le changement d'utilisation d'un site d'épissage 5' après l'ajout d'une séquence riche en guanine.

Partie 2: Différences d'épissage entre les lignées cellulaires HEK293 et HCT116 en réponse aux dommages à l'ADN

Une étude antérieure du laboratoire dans la lignée cellulaire HEK293 a montré comment des stress induits par deux drogues, oxaliplatine et staurosporine, peuvent moduler l'épissage alternatif de *Bcl-x* et d'autres événements d'épissage de gènes participant au cycle cellulaire, à l'apoptose et la réparation de l'ADN (Shkreta et al., 2011). Par ailleurs, il avait été noté que dans la lignée

cancéreuse HCT116, *Bcl-x* n'est pas affecté par la staurosporine (Revil et al., 2007). Dans le but de déterminer si d'autres événements d'épissage sont régulés de manière différente entre deux lignées, nous avons effectué d'autres expériences dans les cellules cancéreuses HCT116 et dans une lignée normale (HIEC) sur les mêmes événements d'épissage avec des traitements à l'oxaliplatine et la staurosporine.

L'analyse des données obtenues a permis de constater que les événements d'épissage et l'amplitude de leur modulation entre lignées sont différentes. Il est à noter tout d'abord, que dans la lignée cellulaire normale HIEC, la staurosporine n'a pas d'effet sur *Bcl-x* (**Fig. 21**), ce qui montre que ce manque d'effet n'est pas unique à la lignée cancéreuse HCT116. Pour un traitement à l'oxaliplatine, 4 événements ressortent en commun entre les trois lignées cellulaires: *BCL2L1* (ou *Bcl-x*), *AURKA*, *INCENP* et *PPP3CB* (**Fig. 19**). La drogue cause à chaque fois les mêmes modulations mais avec des amplitudes différentes entre lignées. D'après l'étude récente du laboratoire dans la lignée cellulaire HEK293 (Cloutier et al., 2018) nous savons que l'épissage de *BCL2L1* est modulé par SRSF10, hnRNPA1 et Sam68 et que celui de *INCENP*, dont le gène code pour une protéine interne au centrosome et impliquée dans le cancer du sein (Kabisch et al., 2015), est modulé par hnRNP A1 et Sam68. Le gène *AURKA*, qui code pour une sérine/thréonine kinase impliquée dans la mitose et la méiose, est retrouvée dans le cancer gastrointestinal (Wang-Bishop et al., 2018), dépend de l'action de SRSF1 qui empêche la production de variants pro-apoptotiques de *Bcl-x*, *Mcl1* et *Casp9* (Moore et al., 2010), et le gène *PPP3CB*, qui code pour une phosphatase, est régulé par Sam68 (Cloutier et al., 2018). Nous avons ainsi 3 gènes retrouvés dans des cancers qui sont affectés à la suite du traitement à l'oxaliplatine dans 3 différentes lignées cellulaires.

Pour chaque lignée cellulaire, d'autres événements différents modulés par les deux drogues apparaissent: 12 pour les cellules HEK293 (*BRCAl*, *SPTAN1*, *EXO1*, *INCENP*, *POGZ*, *F3*, *MCL1*, *BCL2L1*, *KIF13A*, *DOM3z*, *MAP2* et *KITLG*) (**Fig. 16**), 2 pour les cellules HCT116 (*INCENP* et *PPP3CB*) (**Fig. 18**) et 2 pour les cellules HIEC (*CASC4* et *AKIP1*) (**Fig. 18**).

En cherchant des cas similaires à *Bcl-x*, nous avons analysé les événements qui ne réagissent qu'à une seule drogue, en reliant à certains des facteurs d'épissage connus qui sont impliqués (Cloutier et al. 2018). Pour les cellules HEK293 (**Fig. 16**), *MLH3*, modulé par la staurosporine, est régulé par hnRNP A1 et les événements modulés par l'oxaliplatine sont régulés au minimum par hnRNP A1 et Sam68. Pour les cellules HCT116 (**Fig. 18**), *FANCA* est modulé par la staurosporine et

régulé par Sam68 alors que dans les événements réagissant uniquement à l'oxaliplatine, *BCL2L1* est régulé par SRSF10, hnRPA1 et Sam68, et *CHEK1* par hnRNP A1. De plus, *INCENP* qui réagit aux deux drogues, est régulé par hnRNP A1 et Sam68. Par ailleurs, *FANCA* et *CHEK1* sont connus pour interagir ensemble. Il faudra essayer de comprendre les liens entre ces deux gènes et les facteurs hnRNP A1 et Sam68. Pour les cellules HIEC (**Fig. 18**), *TNFRSF10B* réagit seulement à la staurosporine en étant modulé par les mêmes facteurs d'épissage (Sam68, SRSF10, hnRNP A1) que *BCL2L1* et *RBBP8* qui réagissent à l'oxaliplatine. Il doit donc y avoir d'autres facteurs impliqués pour expliquer les différences entre les deux drogues.

Nous constatons que peu d'événements ressortent en commun entre les trois lignées, que ce soit entre des lignées non cancéreuses (cellules HEK293 et HIEC), ou des lignées provenant d'un contexte cellulaire proche (cellules HIEC normales et HCT116 cancéreuses). Ces analyses ont tout de même identifié l'événement d'épissage *INCENP* qui, modulé par hnRNP A1 et Sam68 dans la lignée HEK293, apparaît comme l'unique gène influencé touché par les deux drogues dans toutes les lignées, étant uniquement insensible dans les cellules HIEC traitées à la staurosporine. Il serait intéressant de comprendre ce qui se produit à ce niveau.

A l'aide des études menées au laboratoire, nous connaissons des facteurs impliqués dans la régulation de ces événements d'épissage et dont leurs interactions peuvent être reconfigurées à la suite d'un stress, telles que les interactions entre SRSF10 et hnRNP K/hnRNP F/H avec l'oxaliplatine (Shkreta et al., 2016). Il faudrait donc pousser cette analyse afin d'identifier si ces facteurs sont « *co-optés* » à la suite de dommages à l'ADN, comme SRSF10 et Sam68. Il faut donc accroître les données sur les facteurs impliqués dans les lignées HCT116 et HIEC, par des déplétions par siRNA pour les comparer aux données dans les cellules HEK293, et également tester d'autres lignées cellulaires normales ou cancéreuses appartenant à des contextes cellulaires proches. En utilisant des inhibiteurs, il sera important de déterminer si les facteurs d'épissage sont sujets à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, tel que décrit pour SRSF10 et Sam68, afin d'identifier les mécanismes par lesquels les inhibiteurs affectent l'épissage dans différentes lignées cellulaires. Cela permettra d'affiner le réseau d'interaction entre les gènes et comprendre les mécanismes de régulation sous-jacents.

Partie 3: Remodelage de la chromatine et épissage alternatif

Pour comprendre le lien entre l'état de la chromatine et l'épissage alternatif, nous avons effectué dans des cellules HEK293, des tests avec des inhibiteurs pharmacologiques menant à des modifications de la structure de la chromatine. Nous avons ensuite analysé les mêmes événements d'épissage que dans la deuxième approche. Les traitements seuls n'ont pas eu d'effets importants sur les événements d'épissage. Il semble ainsi que nos événements cibles, dans des conditions normales, ne soient pas affectés par des changements dans la chromatine. En revanche, en combinant les composés avec l'oxaliplatine, deux types de modulations sont observables. En premier, une réduction de l'effet de l'oxaliplatine sur l'épissage de deux gènes (**Fig. 26**). Pour le gène *KIF13A*, codant pour une kinase, l'effet de l'oxaliplatine est diminué par les composés GSK8814 et BAZ2-ICR. Le premier composé cible la protéine ATAD2 qui est associée à des cancers, et le deuxième, les protéines BAZ2A et BAZ2B qui jouent des rôles essentiels dans le remodelage de la chromatine et sont impliqués dans le cancer de la prostate (Spiliotopoulos et al., 2017). L'effet de l'oxaliplatine sur l'épissage de *CASP9*, impliqué dans l'apoptose, est réduit par le composé SGCCBP30 qui cible les acétyltransférases CBP et EP300, et qui est utilisé contre le cancer de la prostate (Xiang et al., 2018).

Le deuxième type de modulation est une stimulation de l'effet de l'oxaliplatine (**Fig. 27**). Le composé JQ1, qui est utilisé comme agent anticancéreux en ciblant la protéine BRD4, stimule l'effet de l'oxaliplatine sur l'épissage du gène *KITLG*, encodant un ligand pour un récepteur tyrosine kinase présent dans la régulation du cycle cellulaire. JQ1 produit également cet effet sur le gène *ZWINT* qui est impliqué dans la formation du kinétochore. Finalement, l'effet de l'oxaliplatine sur l'épissage de *TSSC4* est augmenté par le composé BAY-850 qui cible également ATAD2.

Ces premiers tests préliminaires ouvrent des perspectives intéressantes. Beaucoup des données restent inconnues. Il n'y a pas de liens connus qui relient ces inhibiteurs à l'épissage modifié des gènes cibles. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les composés ciblent un facteur affecté par l'oxaliplatine, positivement ou négativement, qui interagit avec les événements d'épissage modulés dans nos expériences. Ainsi, quand un composé est utilisé seul, il n'a pas d'effet sur nos événements d'épissage choisis. En réponse à l'oxaliplatine, il est possible que ces composés ciblent alors les autres événements d'épissage modifiés. Il faudra explorer les relations entre les gènes cibles et ceux dont l'épissage est modifié par les composés. Nous pourrions ainsi analyser les

événements d'épissage de gènes dont les protéines, ou leur activité, sont modulées par les composés. Il est à noter que des études récentes ont montré des liens entre les histones et les facteurs d'épissage. Des facteurs d'épissage, comme Rbfox2 et Rbfox3, sont recrutés par des histones au niveau de gènes spécifiques, et des modifications d'histones modulent le recrutement de ces facteurs (Kim et al., 2018). Nous pourrions aussi tester d'autres types de composés, notamment des inhibiteurs de méthyltransférase, de déméthylases ou de kinases. Il faudra également vérifier si tous ces composés ont bien un effet sur la chromatine spécifique au gène cible et si oui, quel type d'effet. L'action de ces inhibiteurs pourrait être étudiée dans d'autres lignées cellulaires, en combinaison ou non, entre autres avec la staurosporine, pour déterminer leur action additionnelle sur le remodelage de la chromatine. Des expériences pourront également être réalisées avec des inhibiteurs de la transcription, afin de déterminer l'importance du processus transcriptionnel sur l'impact des composés au niveau des processus d'épissage.

Les différentes approches de ce projet ont mené à des ébauches qui doivent être poursuivies. Si les résultats n'ont pas été concluants, ils ont néanmoins permis d'entrevoir des brèves de réponses. Le premier projet a montré qu'il est possible d'utiliser un modèle simple pour étudier les interactions entre des facteurs d'épissage. Il faudra continuer en essayant d'autres minigènes, et en augmentant la liste des séquences de liaison des protéines à étudier pour emmagasiner le plus de données. Le deuxième projet a montré que des gènes avec des fonctions proches dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose n'ont pas la régulation de leur épissage alternatif affecté par l'oxaliplatine et la staurosporine de la même manière dans la même lignée cellulaire et également individuellement entre les lignées. Néanmoins, quelques cas d'événements d'épissage qui suivent une même tendance ont été trouvés et doivent être approfondis. Bien que les composés, agissant sur la chromatine, qui ont été utilisés, n'ont pas eu d'effet seul sur la régulation de l'épissage des événements d'épissage analysés, la troisième approche a permis de constater des liens entre certains composés et l'oxaliplatine. Cela soulève donc un lien possible qu'il faut investiguer pour découvrir les éléments en commun ciblés par les composés et la drogue.

Remerciements

Voici enfin cette partie qui sera la plus lue de mon manuscrit. C'est un endroit étrange où l'on doit s'ouvrir, mais pas trop, tout en n'oubliant personne. Je vais donc d'ores et déjà annoncer que les personnes concernées se reconnaîtront et qu'il faudra pardonner les omissions involontaires.

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté et pris le temps de corriger mon manuscrit. Dans un second temps, à la vue des événements, je tenais à remercier plus particulièrement ceux qui m'ont permis de terminer malgré les nombreuses embûches. Merci à Nathalie Rivard, Claude Asselin et en particulier à Jennifer Chambers.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes, de tous les laboratoires, que j'ai connus et qui m'ont encouragé, enseigné et donné envie de poursuivre et de faire de la science.

Maintenant, je voudrais remercier tous les gens qui ont été avec moi durant toutes ces aventures. Du Canada, les nombreux amis que je me suis fait m'ont permis de passer de superbes moments. J'ai appris énormément de choses à tous les niveaux et je garde de très bons souvenirs de mes années à Sherbrooke. De la France, tous les amis de longue date qui ont toujours été là et qui me rappellent d'où je viens.

Je remercie également la famille du Nouveau Brunswick dont l'énergie m'a donné un second souffle.

Je remercie ma sœur et mes parents qui m'ont toujours soutenu, encouragé et sans qui rien n'aurait pu se faire. La décision de partir était très difficile, mais elle a valu la peine. Malgré les nombreuses péripéties, on est resté soudé et on a réussi à s'adapter et à avancer.

Et surtout, je remercie Kiersten. La meilleure chose qui me soit arrivée de ce côté du monde et qui a été à mes côtés à chaque instant.

Liste des références

- Adesso, L., Calabretta, S., Barbagallo, F., Capurso, G. et al. (2013) Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway. *Oncogene* 32(23): 2848-2857.
- Amrein, H., Hedley, M.L. et Maniatis, T. (1994) The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2. *Cell* 76(4): 735-746.
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M. et al. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526: 68–74.
- Bang, M.L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J. et al. (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titian isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ. Res.* 89(11): 1065-1072.
- Bielli, P., Bordi, M., Di Biasio, V. et Sette, C. (2014) Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* 42(19): 12070-12081.
- Black, D.L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72(1): 291-336.
- Blanchette, M. et Chabot, B. (1999) Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* 18(7): 1939-1952.
- Brosseau, J., Lucier, J., Lamarche, A., Shkreta, L. et al. (2014) Redirecting splicing with bifunctional oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 42(6): e40.
- Busa, R., Paronetto, M.P., Farini, D., Pierantozzi, E. et al. (2007) The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* 26(30): 4372-4382.
- Busch, A. et Hertel, K.J. (2012) Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3(1): 1-12.

Chabot, B. et Shkreta, L. (2016) Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J. Cell. Biol.* 212(1): 13-27.

Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E. et al. (2002) De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 277(15): 12587-12595.

Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. et Roberts, R.J. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12(1): 1-8.

Clarke, M.F., Appel, I.J., Benedict, M.A., Eipers, P.G. et al. (1995) A recombinant *bcl-xS* adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11024-11028.

Cloutier, A., Shkreta, L., Toutant, J., Durand, M. et al. (2018) hnRNP A1/A2 and Sam68 collaborate with SRSF10 to control the alternative splicing response to oxaliplatin-mediated DNA damage. *Sci. Rep.* 8(1): 2206.

de Almeida S.F., Grosso, A.R., Koch, F., Fenouil, R. et al. (2011) Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18(9): 977-983.

De Conti, L., Baralle, M. et Buratti, E. (2013) Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4(1): 49-60.

de la Mata, M. et Kornblihtt, A.R. (2006) RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 973-980.

Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A. et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489(7414): 101-108.

Dominguez, C., Fisette, J.F., Chabot, B. et Allain F.H. (2010) Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 853-861.

España, L., Fernandez, Y., Rubio, N., Torregrosa, A. et al. (2004) Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* 87(1): 33-44.

Fu, X. D. et Maniatis, T. (1992). The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(5): 1725-1729.

Fuchs, Y. et Steller, H. (2015) Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 16(6): 329-344.

Garneau, D., Revil, T., Fiset, J.F. et Chabot, B. (2005) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* 280(24): 22641-22650.

Gerstberger, S., Hafner, M. et Tuschl, T. (2014) A census of human RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* 15(12): 829-845.

Gräff, J. et Mansuy, M. (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Res.* 192(1): 70-97.

Guil, S., Long, J.C et Cáceres, J.F. (2006) hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell. Biol.* 26(15): 5744-5758.

House, A.E. et Lynch, K.W. (2006) An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(10): 937-944.

Howard, J.M. et Sanford, J.R. (2014) The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6(1): 93-110.

Iñiguez, L.P. et Hernández, G. (2017) The evolutionary relationship between alternative splicing and gene duplication. *Front. Genet.* 14: 8-14.

Isken, O. et Maquat, L.E. (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* 21(15): 1833-1856.

Izquierdo, J. M. Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C. et al. (2005) Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol. Cell* 19(4): 475-484.

Kabisch, M., Bermejo, J.L., Dunnerbier, T., Shibo, Y. et al. (2015) Inherited variants in the inner centromere protein (INCENP) gene of the chromosomal passenger complex contribute to the susceptibility of ER-negative breast cancer. *Carcinogenesis* 36(2): 256-271.

Kalkavan, H. et Green, D.R. (2018) MOMP, cell suicide as BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 25(1): 46-55.

Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D. et al. (2012) Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 40: 2454–2469.

Kervestin, S. et Jacobson, A. (2012) NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(11): 700-712.

Kim, Y.E., Park, C., Kim, Y.E. et Kim, K.K. (2018) Histone and RNA-binding protein interaction creates crosstalk network for regulation of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499(1): 30-36.

Kornblihtt, A.R. (2007). Coupling transcription and alternative splicing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 623: 175-189.

Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705.

Koralewski, T.E. et Krutovsky, K.V. (2011) Evolution of exon-intron structure and alternative splicing. *PLoS One* 6(3): e18055.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921.

Le Hir, H. et Andersen, G.R. (2008) Structural insights into the exon junction complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18(1): 112-119.

Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E. et Moore, M.J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19(24): 6860-6869.

Li, S., Yamada, M., Han, X., Ohler, U. et Benfey, P. N. (2016) High-resolution expression map of the Arabidopsis root reveals alternative splicing and lincRNA regulation. *Dev. Cell* 39: 508–522.

Li, C., Lin, R.R., Lai, M.C., Ouyang, P. et Tarn, W.Y. (2003) Nuclear Pnn/DRS protein binds to spliced mRNPs and participates in mRNA processing and export via interaction with RNPS1. *Mol. Cell. Biol.* 23(20): 7363-7376.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J. et al. (2010) Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327(5968): 996-1000.

Lukong, K. E., Huot, M.E. et Richard, S. (2009) BRK phosphorylates PSF promoting its cytoplasmic localization and cell cycle arrest." *Cell Signal* 21(9): 1415-1422.

Ma, N., Matsunaga, S., Morimoto, A., Sakashita, G. et al. (2011) The nuclear scaffold protein SAF-A is required for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles. *J. Cell Sci.* 124(Pt 3): 394-404.

Ma, K., He, Y., Zhang, H., Fei, Q. et al. (2011) DNA methylation regulated miR-193a-3p dictates resistance of hepatocellular carcinoma to 5-fluorouracil via repression of SRSF2 expression. *J. Biol. Chem.* 287(8): 5639-5649.

Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J.F. et al. (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 623: 123-147.

Matera, A.G. et Wang, Z. (2014) A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.* 15(2): 108-121.

Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck. et al. (2008) E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ.* 15(12): 1815-1823.

Michelle, L., Cloutier, A., Toutant, J., Shkreta, L. et al. (2012) Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators. *Mol. Cell Biol.* 32: 954-967.

Moore, M.J., Wang, Q., Kennedy, C.J. et Silver, P.A. (2010). An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 142(4): 625-636.

Naro, C., Barbagallo, F., Chieffi, P., Bourgeois, C.F. et al. (2014) The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival. *Nucleic Acids Res.* 42(5): 3218-3227.

Nasim, F.H., Hutchison, S., Cordeau, M. et Chabot, B. (2002) High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of common looping out and repression mechanism. *RNA* 8: 1078-1089.

Nilsen, T.W. et Graveley, B.R. (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463(7280): 457-463.

Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J. et Blencowe, B.J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40(12): 1413-1415.

Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C.E. et Sette, C. (2007) The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell. Biol.* 176(7): 929-939.

Paronetto, M.P., Minana, B. et Valcarcel, J. (2011) The Ewing sarcoma protein regulates DNA damage-induced alternative splicing. *Mol. Cell* 43: 353-368.

Pearson, J. L., Robinson, T.J., Munoz, M.J., Komblitt, A.R. et Garcia-Blanco, M.A. (2008) Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing. *J. Biol. Chem.* 283(12): 7949-7961.

Pedrotti, S., Busa, R., Compagnucci, C. et Sette, C. (2012) The RNA recognition motif protein RBM11 is a novel tissue-specific splicing regulator. *Nucleic Acids Res*, 40(3): 1021-1032.

Plötz, M., Gillissen, B., Hossini, A.M., Daniel, P.T. et Eberle, J. (2012) Disruption of the VDAC2-Bak interaction by Bcl-x(S) mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Differ.* 19(12): 1928-1938.

Pray, L. (2008) Eukaryotic genome complexity. *Nature Education* 1(1): 96.

Remy, E., Cabrito, T. R., Baster, P., Batista, R. A. et al. (2013) A major facilitator superfamily transporter plays a dual role in polar auxin transport and drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 901–926.

Revil, T., Pelletier, J., Toutant, J., Cloutier, A. et Chabot, B. (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *J. Biol. Chem.* 284(32): 21458-21467.

Revil, T., Toutant, J., Shkreta, L., Garneau, D. et al. (2007) Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* 27(24): 8431-8441.

Ruirui, K., Ray, P., Yang, M., Wen, P. et al. (2013) Alternative pre-mRNA splicing, cell death, and cancer. *Cancer Treat. Res.* 158: 181-212.

- Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Allo, M. et al. (2009) Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(11): 4325-4330.
- Schwerk, C. et Schulze-Osthoff, K. (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 19: 1-13.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H. et al. (2003) ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 23(8): 2981-2990.
- Sharma, S., Falick, A.M. et Black, D.L. (2005) Polypyrimidine tract binding protein blocks the 5' splice site-dependent assembly of U2AF and the prespliceosomal E complex. *Mol. Cell* 19: 485-496.
- Shengdong, K.E. et Chasin, L.A. (2010) Intronic motif pairs cooperate across exons to promote pre-mRNA splicing. *Genome Biology* 21(8): 1360-1374.
- Shin C, Feng, Y. et Manley J.L. (2004) Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature* 427(6974): 553-558.
- Shin, C. et Manley J.L. (2002) The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell* 111(3): 407-417.
- Shkreta, L., Froehlich, U., Paquet, E.R., Toutant, J. et al. (2008) Anticancer drugs affect the alternative splicing of Bcl-x and other human apoptotic genes. *Mol. Cancer Ther.* 7(6): 1398-1409.
- Shkreta, L., Michelle, L., Toutant, J., Tremblay, M.L. et Chabot, B. (2011) The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* 286(1): 331-340.
- Shkreta, L., Cloutier, A., Toutant, J., Vennin Rendos, H. et Chabot, B. (2015) Regulation of alternative splicing and the case of Bcl-x. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 48(2): 27-38.
- Shkreta, L., Toutant, J., Durand, M., Manley, J.L. et Chabot, B. (2016) SRSF10 connects DNA damage to the alternative splicing of transcripts encoding apoptosis, cell-cycle control, and DNA repair factors. *Cell. Rep.* 17(8): 1990-2003.

Shultz, J. C., Vu, N., Shultz, M.D., Mba, M.U. et al. (2012) The Proto-oncogene PKC δ regulates the alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA. *Mol. Cancer Res.* 10(5): 660-669.

Smith, C.W. et Valcárcel, J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25(8): 321-328.

Spector, D.L. et Lamond, A.I. (2011) Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 3(2).

Spiliotopoulos, D. Wamhoff, E.C., Lolli, G., Rademacher, C. et Caflisch, A. (2017) Discovery of BAZ2A bromodomain ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 139: 564-572.

Tange, T.O., Nott, A., et Moore, M.J. (2004) The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16: 279–284.

Tanuma, N., Kim, S.E., Beullens, M., Tsubaki, Y. et al. (2008) Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155). *J. Biol. Chem.* 283(51): 35805-35814.

Valadkhan, S.A., Mohammadi, A., Jaladat, Y., et Geisler S. (2009) Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two-step splicing reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 106(29):11901-11906.

Venables, J.P., Klinck, R., Koh, C., Gervais-Bird, J. et al. (2009) Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(6): 670-676.

Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I. et al. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456(7221): 470-476.

Wang, Z., Hoffmann, H.M. et Grabowshi, P.J. (1995) Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity. *RNA* 1(1): 21-35.

Wang, Y., Chen, D., Qian, H., Tsai, Y.S. et al. (2014) The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer Cell* 26(3): 374-389.

Wang-Bishop, L., Chen, Z., Gomaa, A., Lockhart, A.C. et al. (2018) Inhibition of AURKA reduces proliferation and survival of gastrointestinal cancer cells with activated KRAS by preventing activation of RPS6KB1. *Gastroenterology* 156(3): 662-675.

- Xiang, Q., Wang, C., Zhang, Y., Xue, X. et al. (2018) Discovery and optimization of 1-(1H-indol-1-yl)ethanone derivatives as CBP/EP300 bromodomain inhibitors for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Med. Chem.* 147: 238-252.
- Xiao, S.H. et Manley, J.L. (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.* 11(3): 334-344.
- Yeo, G., Holste, D., Kreiman, G. et Burge, C.B. (2004) Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* 5(10): R74.
- Zhiguo, E., Wang, L., et Zhou, J. (2013) Splicing and alternative splicing in rice and humans. *BMB Rep.* 46: 439-447.
- Zhiqiang, H., Hamish, S.S., Guangrong, Q., Guangyong, Z. et al. (2015) Revealing missing human protein isoforms based on Ab Initio prediction, RNA-seq and proteomics. *Sci. Rep.* 5: 10940.
- Zhou, H.L., Hinman, M.N., Barron, V.A., Geng, C. et al. (2011) Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(36): 627-635.
- Zhou, A., Ou, A.C., Cho, A., Benz, E.J. et Jr. Huang, S.C. (2008) Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection. *Mol. Cell. Biol.* 28(19): 5924-5936.

Annexes

Tableau supplémentaire S1. Événements d'épissage alternatif affectés par l'oxaliplatin et la staurosporine dans les lignées cellulaires HEK293, HCT116 et HIEC. Pour la lignée HEK293, il a été effectué 5 expériences en triplicat avec un traitement à l'oxaliplatin et 3 expériences en triplicat avec un traitement à la staurosporine. Pour les lignées HCT116 et HIEC, il a été effectué une expérience en triplicat pour chaque drogue. Les événements sont classés par ordre alphabétique. La valeur PSI (Percent Splicing Index) indique la quantité de l'isoforme long pour chacun des événements. Les événements avec un $\Delta\text{PSI} \geq 5$ et un $P < 0.05$ ont été choisis et sont indiqués en vert.

Tableau supplémentaire S2. Événements d'épissage alternatif affectés par l'oxaliplatin et les 14 composés (GSK8814, BAY-850, BAZ2801, BAZ2-ICR, BI-9564, NI-57, GSK6853, BAY-299, SGCCBP30, ICBP112, NVS-CECR2-1, PFI-3, GSK484 et JQ1) dans la lignée cellulaire HEK293. Les tests ont été effectués en triplicat. Les événements sont classés par ordre alphabétique. La valeur PSI (Percent Splicing Index) indique la quantité de l'isoforme long pour chacun des événements. Les événements avec un $\Delta\text{PSI} \geq 10$ et un $P < 0.05$ ont été choisis et sont indiqués en vert.

Tableau S1 :

HEK293													
OXALI													
expérience 1				expérience 2				expérience 3					
cut-off DPSI: > 10 , P value < 0.05				cut-off ΔPSI: > 10 , P value < 0.05				cut-off DPSI: > 10					
Gene	Gene	DPSI(OXALI-CTRL)	st.dev	P values	Gene	ΔPSI(OXALI-CTRL)	st.dev	P values	Gene	DPSI(OXALI-CTRL)	st.dev	P values	
AKAP13									AKAP13	0.320	0.497	0.326775	
AKIP1	AKIP1	-8.777	4.222	0.067415	AKIP1	-8.156	2.752	0.006819	AKIP1	-7.516	1.882	0.002292	
APAF1									APAF1	-4.508	8.234	0.396638	
ARID4B	ARID4B	-2.382	6.041	0.715100	ARID4B	-8.778	10.815	0.232475	ARID4B	-7.703	2.520	0.025744	
AURKA	AURKA	11.938	3.498	0.004099	AURKA	14.840	5.327	0.008493	AURKA	6.962	1.177	0.000512	
AURKB	AURKB	8.137	7.645	0.326121	AURKB	-14.037	6.215	0.053289	AURKB	6.622	7.054	0.179320	
AXIN1	AXIN1	-3.104	2.428	0.091257	AXIN1	-1.681	4.535	0.652481	AXIN1	-5.820	2.441	0.014503	
AXL													
BAX	BAX								BAX	4.906	2.337	0.022047	
BCL2L1	BCL2L1	-48.917	3.036	0.000092	BCL2L1	-51.429	7.233	0.000250	BCL2L1	-41.097	7.631	0.000735	
BCL2L11	BCL2L11	6.951	2.027	0.004031	BCL2L11	14.196	4.092	0.003862					
BCLAF1	BCLAF1	-7.480	5.847	0.002969	BCLAF1	-3.124	2.054	0.057892	BCLAF1	-1.643	12.550	0.831718	
BCLAF1	BCLAF1	-9.684	2.599	0.091035	BCLAF1	-5.248	6.586	0.239655	BCLAF1	-15.679	1.642	0.000078	
BNIP1	BNIP1	-3.570	6.184	0.373901									
BRCA1	BRCA1	-40.740	2.971	0.000019	BRCA1	-44.921	3.851	0.000035	BRCA1	-38.928	5.744	0.000301	
BRCA1													
CASC4	CASC4	-4.541	2.045	0.018375	CASC4	-5.825	1.129	0.000866	CASC4	-7.106	1.676	0.001832	
CASP8	CASP8	-28.198	4.864	0.000553	CASP8	-34.666	1.400	0.000060	CASP8	-23.472	1.240	0.000005	
CASP9	CASP9	30.564	6.661	0.008474	CASP9	15.020	5.401	0.008542	CASP9	14.509	6.722	0.020143	
CDC25A	CDC25A				CDC25A	-0.984	32.013	0.960112	CDC25A	-5.114	1.846	0.008665	
CDC25B	CDC25B	-10.949	2.063	0.000778	CDC25B	-11.017	1.688	0.000349	CDC25B	-6.719	1.732	0.002552	
CDK1									CDK1	-0.237	0.672	0.574070	
CDK2									CDK2	-0.620	0.469	0.084037	
CDKN1A	CDKN1A								CDKN1A	0.323	0.559	0.373901	
CEP170	CEP170	15.460	1.555	0.000067	CEP170	19.697	2.298	0.000120					
CEP170					CEP170	19.697	2.298	0.000120					
CHEK1	CHEK1	9.770	2.136	0.001373	CHEK1	4.118	3.198	0.089563	CHEK1	5.229	2.291	0.016776	
CHEK2	CHEK2	-61.426	1.595	0.000000	CHEK2	-56.812	2.985	0.000005	CHEK2	-43.021	4.936	0.000112	
CHEK2-2	CHEK2-2								CHEK2-2	-3.683	1.775	0.022889	
DOM3Z	DOM3Z	-58.300	6.856	0.000124	DOM3Z	-55.302	2.178	0.000002	DOM3Z	-62.167	1.697	0.000000	
ESYT2	ESYT2	-11.553	0.505	0.000002	ESYT2	-12.673	1.494	0.000125	ESYT2	-14.738	2.039	0.000234	
EXO1	EXO1	16.663	3.189	0.000826	EXO1	14.231	1.518	0.000084	EXO1	5.859	1.241	0.001216	
F3	F3	19.351	4.971	0.002522	F3	15.864	8.937	0.037132					
FANCA	FANCA	-6.024	1.596	0.002827	FANCA	-11.983	3.653	0.004737					
FASTK	FASTK	-4.391	3.785	0.159573	FASTK	-9.411	8.509	0.127906	FASTK	-6.427	1.358	0.001205	
FASTK													
FGFR1OP													
FOXM1	FOXM1	4.607	1.629	0.008056	FOXM1	3.260	1.395	0.015508					
FYN													
GPR137	GPR137	-26.619	3.812	0.000268	GPR137	-26.157	9.530	0.021510					
GTF2H2	GTF2H2	11.024	0.606	0.000006	GTF2H2	11.090	1.029	0.000048	GTF2H2	7.328	1.547	0.001201	
INCCENP	INCCENP	-40.703	1.619	0.000002	INCCENP	-48.034	1.290	0.000000					
ITGB3BP									ITGB3BP	-3.456	5.986	0.373901	
KIF13A	KIF13A	-30.523	6.323	0.001119	KIF13A	-38.376	5.707	0.000311					
KITLG	KITLG	24.757	4.189	0.000513	KITLG	16.953	1.599	0.000052					
LGALS9	LGALS9	31.602	9.255	0.018528	LGALS9	36.505	24.094	0.224893					
LIG3													
MAP2	MAP2	-45.971	2.134	0.000003	MAP2	-49.723	1.143	0.000010					
MAPK10	MAPK10	29.754	6.565	0.008929	MAPK10	-11.645	20.169	0.373901					
MCL1	MCL1	14.525	1.454	0.000065	MCL1	15.731	0.493	0.000001	MCL1	8.482	1.075	0.000166	
MLH3	MLH3	0.603	3.331	0.769438	MLH3	-11.436	8.653	0.083925	MLH3	-18.142	6.754	0.009643	
NAP1L4	NAP1L4	-16.157	1.466	0.000044	NAP1L4	-18.874	1.466	0.000024	NAP1L4	-13.904	1.174	0.000033	
NDEL1													
PCBP4	PCBP4	-15.337	9.657	0.051322	PCBP4	-9.986	1.851	0.000731	PCBP4	-7.837	3.370	0.015756	
POGZ	POGZ	15.333	2.963	0.000858	POGZ	21.577	3.557	0.000464					
PPP3CB	PPP3CB	-42.728	5.326	0.000156	PPP3CB	-37.261	4.955	0.000201					
RAD17									RAD17	-4.090	1.513	0.009443	
RBBP8	RBBP8	-25.104	4.272	0.000525	RBBP8	-27.044	1.785	0.000013	RBBP8	-24.029	2.406	0.000066	
RBM41													
RCC1	RCC1	-12.936	2.974	0.001662	RCC1	-9.461	4.217	0.017756					
RP11	RP11	-25.075	1.480	0.000008	RP11	-25.627	3.471	0.000215					
SDCCAG8	SDCCAG8	-21.267	#DIV/0!	#DIV/0!	SDCCAG8	-14.037	0.754	0.001439	SDCCAG8	-21.124	3.690	0.000581	
SLIT2	SLIT2	-36.714	2.835	0.000023	SLIT2	-41.083	1.157	0.000000					
SPTAN1	SPTAN1	-20.367	0.260	0.000000	SPTAN1	-18.852	0.431	0.000000	SPTAN1	-15.458	1.631	0.000081	
TNFRSF10I	TNFRSF10I	23.379	2.697	0.000115	TNFRSF10I	29.500	1.865	0.000011	TNFRSF10B	21.604	2.623	0.000140	
TSSC4	TSSC4	-21.284	8.246	0.011068	TSSC4	-20.881	3.385	0.003688					
UTRN	UTRN	-11.737	2.143	0.000690	UTRN	-18.207	7.674	0.014741					
ZWINT	ZWINT	-13.476	1.592	0.000126	ZWINT	-14.486	2.484	0.000540					

HEK293

OXALI

expérience 4				expérience 5				Moyenne		bilan	
Gene	cut-off DPSI: > 10 , P value < 0.05 DPSI(OXALI-CTRL)	st.dev	P values	Gene	cut-off DPSI: > 10 , P value < 0.05 ΔPSI(OXALI-CTRL)	st.dev	P values	Gene	nombre	Gene moy ΔPSI(OXALI-CTRL)	
										AURKA 10.83	
										BCL2L1 -42.10102	
AKIP1	-10.839	5.482	0.1192	AKIP1	-0.036	5.621214	0.991719283			BRCA1 -37.56467333	
APAF1	0.000	0.000	#DIV/0!	APAF1	0.000	0	#DIV/0!			CASC4 -6.680126667	
ARID4B	19.226	19.226	0.3739	ARID4B	0.000	0	#DIV/0!			CASP8 -35.13746333	
AURKA	9.857	1.568	0.0033	AURKA	10.549	3.589476	0.007030674	AURKA	10.83	5	CASP9 22.05784667
AURKB	23.153	8.916	0.0602	AURKB	10.417	11.8953	0.203928299			CDC25B -13.17000667	
AXIN1	2.602	5.416	0.6560	AXIN1	-1.448	7.7227	0.76163386			CEP170 16.926225	
AXL	-33.333	47.140	0.5185	AXL	0.000	0	#DIV/0!			CHEK2 -52.10195833	
										ESYT2 -12.89391417	
BCL2L1	-37.970	3.374	0.0004	BCL2L1	-31.093	11.56968	0.009627049	BCL2L1	-42.10	5	FANCA -10.07785
BCL2L11	7.967	2.789	0.0461	BCL2L11	6.576	5.187392	0.093109403			GPR137 -28.3112	
BCLAF1	-13.498	0.821	0.0001	BCLAF1	-12.733	5.583784	0.016822701			GTF2H2 8.440565333	
BCLAF1	-13.735	0.987	0.0002	BCLAF1	0.000	0	#DIV/0!			INCENP -44.615375	
BNIP1	-0.648	0.150	0.0126	BNIP1	-2.299	3.87187	0.361845979			KIF13A -35.3435125	
BRCA1	-34.799	1.214	0.0000	BRCA1	-28.436	1.842779	1.16497E-05	BRCA1	-37.56	5	KITLG 19.29505556
BRCA1	-42.936	1.251	0.0000	BRCA1	-37.642	4.192208	9.97937E-05			MAP2 -39.31181667	
CASC4	-9.642	1.371	0.0022	CASC4	-6.287	2.962168	0.021271232	CASC4	-6.68	5	MCL1 12.44574667
CASP8	-59.382	5.631	0.0005	CASP8	-29.970	1.01192	8.64235E-07	CASP8	-35.14	5	NAP1L4 -16.61016733
CASP9	18.964	6.015	0.0344	CASP9	31.232	8.599879	0.003263198	CASP9	22.06	5	POGZ 16.7514
CDC25A	-5.651	1.088	0.0065	CDC25A	-2.716	2.683031	0.154406055			PPP3CB -39.42495833	
CDC25B	-19.337	1.562	0.0002	CDC25B	-17.828	1.959024	9.4635E-05	CDC25B	-13.17	5	RBBP8 -22.94055333
										SDCCAG8 -20.09336	
										SPTAN1 -20.1494429	
										TNFRSF10I 25.60978	
CEP170	18.683	1.893	0.0006	CEP170	13.865	4.989716	0.008566475	CEP170	16.93	4	TSSC4 -17.71827083
CHEK1	-1.745	3.303	0.6253	CHEK1	0.000	0	#DIV/0!			UTRN -18.33216667	
CHEK2	-47.148	2.847	0.0001	CHEK2	0.000	0	#DIV/0!	CHEK2	-52.10	4	ZWINT -12.77018333
Dom3z	0.000	0.000	#DIV/0!	Dom3z	0.000	0	#DIV/0!				
ESYT2	-12.612	0.681	0.0000	ESYT2	-20.615	15.60588	0.457898105	ESYT2	-12.89	4	
EXO1	10.942	0.742	0.0001	EXO1	0.000	0	#DIV/0!				
F3	18.981	5.929	0.0328	F3	9.325	8.24608	0.121737819				
FANCA	-13.970	1.456	0.0007	FANCA	-8.335	2.383157	0.003749023	FANCA	-10.08	4	
FASTK	-20.031	5.744	0.0252	FASTK	21.532	49.67593	0.494554442				
FGFR1OP	-17.664	12.048	0.2165	FGFR1OP	-21.240	1.899671	4.19107E-05				
FOXM1	2.284	1.504	0.2035	FOXM1	0.711	2.55814	0.655206898				
FYN	0.000	0.000	#DIV/0!	FYN	0.000	0	#DIV/0!				
GPR137	-31.638	3.832	0.0012	GPR137	-28.830	5.160277	0.000638127	GPR137	-28.3112	4	
GTF2H2	5.070	0.562	0.0008	GTF2H2	7.691	1.551168	0.001010259	GTF2H2	8.440565333		
INCENP	-48.245	2.359	0.0000	INCENP	-41.479	4.710477	0.000107776	INCENP	-44.615375	4	
KIF13A	-44.629	3.248	0.0002	KIF13A	-27.847	3.724005	0.000205019	KIF13A	-35.3435125	4	
KITLG	16.175	1.205	0.0002	KITLG	18.644	15.91856	0.112391505	KITLG	19.29505556	3	
LGALS9	26.391	11.588	0.0850	LGALS9+A	69.359	32.98243	0.021919094				
LIG3	0.000	0.000	#DIV/0!	LIG3	0.000	0	#DIV/0!				
MAP2	-45.055	5.623	0.0013	MAP2	-55.810	10.09824	0.000665396	MAP2	-39.31181667	4	
MAPK10	-36.228	4.214	0.0010	MAPK10	-38.542	12.10923	0.507247011				
MCL1	11.651	0.435	0.0000	MCL1	11.839	2.263696	0.000823158	MCL1	12.44574667	5	
MLH3	-10.499	7.436	0.2308	MLH3	-5.402	9.820008	0.394620785				
NAP1L4	-15.951	1.726	0.0008	NAP1L4	-18.165	1.18694	1.20379E-05	NAP1L4	-16.61016733	5	
NDEL1	-27.193	3.464	0.0014	NDEL1	-24.021	8.760563	0.008976067				
PCBP4	-8.435	4.124	0.1103	PCBP4	-9.902	8.800222	0.123121584				
POGZ	15.001	0.888	0.0001	POGZ	15.094	3.016907	0.000975658	POGZ	16.7514	4	
PPP3CB	-39.283	2.188	0.0001	PPP3CB	-38.428	3.882126	6.78917E-05	PPP3CB	-39.42495833	4	
RBBP8	-23.912	1.444	0.0001	RBBP8	-14.614	2.320343	0.000401008	RBBP8	-22.94055333	5	
RBM41	-4.695	4.695	0.3739	RBM41	0.000	0	#DIV/0!				
RCC1	-7.783	3.243	0.0744	RCC1	-9.300	5.19366	0.036166172				
SDCCAG8	-23.618	0.765	0.0000	SDCCAG8	-20.421	3.406166	0.000485576	SDCCAG8	-20.09336	5	
SLIT2	0.000	0.000	#DIV/0!	SLIT2	0.000	0	#DIV/0!				
SPTAN1	-22.868	0.869	0.0000	SPTAN1	-23.203	1.255595	5.67988E-06	SPTAN1	-20.1494429	5	
TNFRSF10B	30.820	1.356	0.0000	TNFRSF10I	22.746	3.769674	0.000473677	TNFRSF10I	25.60978	5	
TSSC4	-9.509	2.842	0.0287	TSSC4	-19.198	6.614112	0.007346791	TSSC4	-17.71827083	4	
UTRN	-13.969	5.388	0.0605	UTRN	-11.084	9.58755	0.115809975	UTRN	-18.33216667	3	
ZWINT	-12.573	2.216	0.0048	ZWINT	-10.546	2.214024	0.001177545	ZWINT	-12.77018333	4	

HEK293
STAURO

experience 1			experience 2			experience 3			bilan					
Gene	cut-off ΔPSI>=10 P value<0.05	P values	Gene	cut-off ΔPSI>=10 P value<0.05	P values	Gene	cut-off ΔPSI>=10 P value<0.05	P values	Gene	cut-off ΔPSI>=10 P value<0.05	P values	Gene	cut-off ΔPSI>=10 P value<0.05	P values
AKAP13														
AKIP1	-9.185	0.04681	AKIP1	-8.203	1.703	0.005	AKIP1	-0.199	4.449199	0.942009035		AURKA	8.50270667	
APAF1							APAF1	0.000	0	#DIV/0!		BCL2L1	-46.5911	
ARID4B							ARID4B	0.000	0	#DIV/0!		BRCA1	-11.09645556	
AURKA	7.636	0.00856	AURKA	11.116	0.398	0.010	AURKA	6.756	2.576476	0.010482333		DOM3Z	-48.056	
AURKB	20.682	0.06837	AURKB	-7.568	6.484	0.068	AURKB	7.988	10.50482	0.25817133		EXO1	31.25481667	
AXIN1	-2.790	0.03988	AXIN1				AXIN1	-1.148	5.214179	0.7232323703		FOXM1	13.15968333	
AXL							AXL	6.071	10.51551	0.373900966		GT2H2	7.53546556	
BAX												INCENP	-36.11196667	
BCL2L1	-50.216	5.582	0.00005	BCL2L1	-46.941	7.158	0.000	BCL2L1	-42.617	14.02008	0.006233721	BCL2L1	-22.1638444	
BCL2L11	1.629	1.555	0.11878	BCL2L11	10.844	1.786	0.001	BCL2L11	-9.288	3.9231	0.0148407562	MAP2	39.95587778	
BCLAF1	-9.848	1.494	0.00688	BCLAF1	-14.964	3.497	0.002	BCLAF1	15.238	1.302998	3.50719E-05	MAPK10	-39.98925556	
BCLAF1	-5.991	2.480	0.01047	BCLAF1	1.072	1.717	0.264	BCLAF1	-22.866	4.639397	0.001033348	MCL1	12.95866667	
BNIP1	-3.570	6.184	0.18695	BNIP1	0.000	0.000	0.500	BNIP1	1.301	3.24197	0.5232338035	MLH3	18.84445	
BRCA1	-2.948	0.797	0.01771	BRCA1	-5.138	0.933	0.001	BRCA1	1.695	2.30677	0.270926169	POGZ	17.68148333	
BRCA1	-8.272	3.884	0.00326	BRCA1	-14.371	5.421	0.002	BRCA1	-10.646	3.750282	0.007946765	RCC1	-8.73294444	
CASC4	-0.505	2.678	0.35196	CASC4	0.427	0.507	0.344	CASC4	-0.644	1.154958	0.388820829	RCC1	-15.24205	
CASP8	-14.091	#DIV/0!	#DIV/0!	CASP8				CASP8	-19.521	1.94795	6.46609E-05	SPTAN1	-18.97238889	
CASP9	13.978	#DIV/0!	#DIV/0!	CASP9				CASP9	11.162	9.346887	0.107434578	TNFRSF10I	-6.4456	
CDC25A	-0.716	0.662	0.11362	CDC25A	-0.146	1.187	0.419	CDC25A	-0.584	2.868148	0.742048793	TSSC4	-8.18478333	
CDC25B	-3.882	1.768	0.03702	CDC25B	-1.786	1.341	0.140	CDC25B	-9.280	1.871844	0.001010409	UTRN	-5.57798889	
CDK2														
CDKN1A														
CEP170	-0.350	2.618	0.40224	CEP170	2.913	2.844	0.047							
CEP170														
CHEK1	8.628	2.818	0.00178	CHEK1	1.342	4.239	0.255	CHEK1	0.000	0	#DIV/0!			
CHEK2								CHEK2	0.000	0	#DIV/0!			
CHEK2-2														
DOM3Z	-47.135	5.866	0.00018	DOM3Z	-50.476	0.246	0.000	DOM3Z	0.000	0	#DIV/0!	DOM3Z	-48.8056	2
ESYT2	-7.479	7.539	0.00011	ESYT2	-7.539	1.199	0.001	ESYT2	8.724	15.1107	0.373900966			
EXO1	26.818	2.093	0.00001	EXO1	35.691	1.584	0.000	EXO1	0.000	0	#DIV/0!	EXO1	31.25482	2
F3	12.179	8.295	0.01554	F3	14.140	8.398	0.023	F3	6.816	9.049371	0.262032949	F3	13.15968	2
FANCA	5.590	3.023	0.03771	FANCA	0.864	2.517	0.302	FANCA	0.579	3.130795	0.764838405			
FANCB	4.417	8.739	0.17680	FANCB	6.293	14.212	0.210	FANCB	29.215	49.69455	0.366136735			
FASTK				FASTK				FASTK						
FGFR3BP														
FGFR3BP														
FOXM1	17.244	2.277	0.00004	FOXM1	26.427	2.943	0.000	FOXM1	-12.010	3.134368	0.002674549			
FYN	-9.319	3.857	0.03905	FYN	-11.720	7.252	0.078	FYN	15.805	1.370169	3.70374E-05	FOXM1	19.8253	
GPR137	6.254	1.146	0.00042	GPR137	11.650	1.577	0.000	GPR137	-18.186	6.616827	0.00890305	GPR137	7.535466	int
GT2H2	-31.567	0.905	0.00000	GT2H2	-39.795	2.302	0.000	GT2H2	4.702	1.657186	0.007958731	GT2H2	-36.112	
INCENP	-16.917	1.543	0.00046	INCENP	41.229	1.236	0.000	INCENP	-36.974	4.949825	0.000205871	INCENP	-22.1634	
ITGB3BP														
KIF13A	36.586	3.791	0.00004	KIF13A	-28.774	8.832	0.001	KIF13A	42.052	15.53474	0.009387417	KIF13A	39.95588	
KITLG	-11.164	13.881	0.16991	KITLG	40.263	35.430	0.211	KITLG	43.609	32.42349	0.080289118	KITLG	-15.2421	
LGALS9				LGALS9				LGALS9						
MAP2	-32.556	1.476	0.00001	MAP2	-41.710	0.309	0.000	MAP2	-45.702	9.6553	0.001205987	MAP2	-39.9893	
MAPK10	-23.589	7.170	0.00592	MAPK10	-20.779	24.911	0.057	MAPK10	-21.924	11.60397	0.030718857	MAPK10	-22.7565	2
MCL1	12.754	1.785	0.00005	MCL1	16.223	1.200	0.000	MCL1	9.900	2.584351	0.002677825	MCL1	12.95867	
MLH3	21.119	7.034	0.00095	MLH3	5.787	2.127	0.004	MLH3	16.570	8.822017	0.031280981	MLH3	18.84445	2
NAP1L4	0.007	1.610	0.49854	NAP1L4	-5.787	2.127	0.004	NAP1L4	-1.624	1.569227	0.147531948			
NDEL1	-7.242	5.252	0.14319	NDEL1	-2.746	0.529	0.061	NDEL1	-11.277	8.972068	0.095065857			
PCBP4	11.031	0.455	0.00079	PCBP4	26.712	4.282	0.000	PCBP4	-2.764	8.265344	0.593551044			
POGZ	1.059	0.278	0.10401	POGZ	4.218	4.300	0.060	POGZ	15.302	2.878807	0.000773341	POGZ	17.68148	
PPP3CB	-7.381	2.049	0.02644	PPP3CB	-15.980	1.815	0.000	PPP3CB	3.322	2.554457	0.087432922			
RAD17														
RBBP8	-9.245	2.963	0.00095	RBBP8	-10.659	5.382	0.036	RBBP8	-2.656	2.123779	0.09621712	RBBP8	-8.73294	
RBM41	-13.602	0.561	0.00010	RBM41	-16.877	1.195	0.000	RBM41	-6.894	2.025918	0.004143742	RCC1	-15.2421	
RCC1	-9.245	2.963	0.00095	RCC1	-10.659	5.382	0.036	RCC1	-5.344	2.063291	0.010941049	RCC1	-8.73294	
RP11	-13.602	0.561	0.00010	RP11	-16.877	1.195	0.000	RP11	-5.344	2.063291	0.010941049	RP11	-15.2421	
SDCCAG8	-2.254	2.579	0.23105	SDCCAG8	-3.790	11.054	0.234	SDCCAG8	-2.656	2.123779	0.09621712	SDCCAG8	-8.73294	
SLIT2								SLIT2						
SPTAN1	-16.774	1.156	0.00001	SPTAN1	-18.177	1.195	0.000	SPTAN1	-21.966	2.100553	5.46362E-05	SPTAN1	-18.9724	
TNFRSF10E	-6.798	3.318	0.00515	TNFRSF10E	-5.802	0.907	0.018	TNFRSF10E	-6.736	3.78007	0.036698139	TNFRSF10E	-6.4456	
TSSC4	-16.370	9.626	0.01330	TSSC4	-16.862	4.576	0.001	TSSC4	-9.406	5.538774	0.042319992	TSSC4	-8.18478	2
UTRN	-4.461	1.544	0.00434	UTRN	-4.847	3.275	0.049	UTRN	-9.406	5.538774	0.042319992	UTRN	-5.57799	
ZWINT	-3.198	2.659	0.02210	ZWINT	-5.706	3.872	0.015	ZWINT	0.556	2.660092	0.735678438	ZWINT	-5.57799	

Gene	HIEC								HTC 116							
	OXALI				STAURO				OXALI				STAURO			
	Gene	Δ(OXALI-CT)	St.dev	P values	Gene	(STAURO-C)	St.dev	P values	Gene	Δ(OXALI-CT)	St.dev	P values	Gene	(STAURO-C)	St.dev	P values
	cut-off ΔPSI: > 10 , P value <0.05								cut-off ΔPSI: > 10 , P value <0.05							
AKAP13	AKAP13				AKAP13				AKAP13				AKAP13			
AKIP1	AKIP1	-15.7026	0.037757	0.023499	AKIP1	-13.597	0.045664	0.013618	AKIP1	-19.6121	0.054437	0.016552	AKIP1	0.727	0.069488	0.861124
APAF1	APAF1				APAF1				APAF1				APAF1			
ARID4B	ARID4B				ARID4B				ARID4B				ARID4B			
AURKA	AURKA	19.842	0.045918	0.026275	AURKA	16.70548	0.286414	0.817379	AURKA	22.62583	0.045918	0.001471	AURKA	-51.728	0.286414	0.113689
AURKB	AURKB	-19.5285	0.414261	0	AURKB	-19.5285	0.414261	0	AURKB	-2.30225	0.288033	0.596381	AURKB	-11.729	0.226084	0.261884
AXIN1	AXIN1	2.28501	0.086882	0.620591	AXIN1	6.63082	0.059781	0.143096	AXIN1	-3.02199	0.16964	0.839649	AXIN1	6.699	0.123016	0.4917
AXL	AXL				AXL				AXL				AXL			
BAX	BAX				BAX				BAX				BAX			
BCL2L1	BCL2L1	-23.8151	0.027383	0.047629	BCL2L1	-4.4055	0.020413	0.052011	BCL2L1	-25.576	0.05204	0.031058	BCL2L1	1.564	0.036236	0.57447
BCL2L11	BCL2L11	13.39882	0.083181	0.832106	BCL2L11	-0.41432	0.017492	0.424377	BCL2L11	22.76133	0.049145	0.004316	BCL2L11	1.932	0.048719	0.670377
BCLAF1	BCLAF1	-44.9534	0.03757	0	BCLAF1	4.031167	0.045227	0.300741	BCLAF1	-13.3306	0.056463	0.042651	BCLAF1	49.482	0.011395	0
BCLAF1	BCLAF1	-8.52123	0.047773	0.08175	BCLAF1	5.610067	0.054439	0.229916	BCLAF1	30.12617	0.021921	0	BCLAF1	5.332	0.057824	0.223344
BNIP1	BNIP1	-0.5569	0.049264	0.881996	BNIP1	2.698053	0.037656	0.295068	BNIP1	0	0	0	BNIP1	0.000	0	0.000
BRCA1	BRCA1	-8.73208	0.020549	0.119074	BRCA1	-3.07797	0.205546	0.826761	BRCA1	-7.90347	0.161347	0.578245	BRCA1	3.251	0.101142	0.101142
BRCA1	BRCA1	-31.0003	0.267347	0.133011	BRCA1	-1.24047	0.031311	0.041479	BRCA1	-33.4391	0.021917	#DIV/0!	BRCA1	-1.722	0.021724	#DIV/0!
CASC4	CASC4	10.43213	0.025841	0.018	CASC4	10.9533	0.045509	0.040537	CASC4	11.6732	0.025252	0.017917	CASC4	-8.262	0.008509	0.002434
CASP8	CASP8	-7.91577	0.011861	0.007401	CASP8	-3.69467	0.036026	0.217667	CASP8	-8.00657	0.090039	0.337727	CASP8	0.108	0.068382	0.926887
CASP9	CASP9	30.01783	0.137728	0.065548	CASP9	14.9857	0.130383	0.258478	CASP9	35.9682	0.231871	0.10103	CASP9	25.461	0.117979	0.100733
CDC25A	CDC25A	-48.4512	0.020419	0	CDC25A	1.303233	0.057932	0.758753	CDC25A	-48.4512	0.020419	0	CDC25A	1.303	0.057932	0
CDC25B	CDC25B	0.290567	0.013374	0.66401	CDC25B	7.329867	0.033432	0.029152	CDC25B	-11.5809	0.045797	0.051299	CDC25B	-6.454	0.018128	0.029888
CDK1	CDK1				CDK1				CDK1				CDK1			
CDK2	CDK2				CDK2				CDK2				CDK2			
CDKN1A	CDKN1A				CDKN1A				CDKN1A				CDKN1A			
CEP170	CEP170	13.30997	0.042079	0.004616	CEP170	18.81203	0.057096	0.052189	CEP170	32.92647	0.053956	0.486404	CEP170	26.116	0.043681	0.670632
CEP170	CEP170				CEP170				CEP170				CEP170			
CHEK1	CHEK1	-12.8808	0.042266	0.041437	CHEK1	7.1849	0.052903	0.163066	CHEK1	-16.8312	0.029632	0.012351	CHEK1	1.104	0.03037	0.60593
CHEK2	CHEK2	-25.2071	0.140384	0.156422	CHEK2	-13.7063	0.136515	0.106599	CHEK2	-30.5142	0.042508	0.009892	CHEK2	-2.537	0.038882	0.466385
CHEK2-2	CHEK2-2				CHEK2-2				CHEK2-2				CHEK2-2			
DOM3Z	DOM3Z	3.308867	0.173453	0.757181	DOM3Z	20.91817	0.169911	0.157369	DOM3Z	16.49777	0.08546	0.07255	DOM3Z	7.959	0.060271	0.094732
ESYT2	ESYT2	-0.54976	0.004005	0.852394	ESYT2	1.988903	0.029828	0.368701	ESYT2	30.4347	0.003877	0	ESYT2	54.597	0.005384	0
EXO1	EXO1				EXO1				EXO1				EXO1			
F3	F3	-0.0693	0.03673	0.966614	F3	7.719533	0.035682	0.050481	F3	-11.1238	0.025244	0.025247	F3	3.349	0.008159	0.029489
FANCA	FANCA	-2.67857	0.145432	0.732282	FANCA	9.717033	0.104843	0.285444	FANCA	-4.1541	0.021684	0.10618	FANCA	12.216	0.009679	0.002543
FASTK	FASTK				FASTK				FASTK				FASTK			
FASTK	FASTK				FASTK				FASTK				FASTK			
FGFR1OP	FGFR1OP	1.118567	0.021255	0.507435	FGFR1OP	-13.3761	0.03273	0.000966	FGFR1OP	-0.31787	0.023546	0.865794	FGFR1OP	-13.876	0.016129	0.004392
FOXM1	FOXM1	-0.3136	0.015636	0.799433	FOXM1	0.461967	0.008001	0.42265	FOXM1	-6.01877	0.015645	0.040672	FOXM1	2.614	0.01763	0.067072
FYN	FYN				FYN				FYN				FYN			
GPR137	GPR137	-1.2842	0.058056	0.560548	GPR137	1.046133	0.037987	0.634919	GPR137	-19.7532	0.124265	0.14135	GPR137	-40.461	0.145481	0.265712
GTF2H2	GTF2H2	14.2184	0.057875	0.017009	GTF2H2	-1.86607	0.021899	0.318643	GTF2H2	7.671533	0.018791	0.022846	GTF2H2	1.306	0.007191	0.129597
INCENP	INCENP	-16.0287	0.032303	0.001957	INCENP	-4.06253	0.021423	0.019793	INCENP	-29.8806	0.020056	0.001151	INCENP	-13.678	0.034133	0.026288
ITGB3BP	ITGB3BP				ITGB3BP				ITGB3BP				ITGB3BP			
KIF13A	KIF13A	0	0.116891	0.064521	KIF13A	1.0532	0.035146	0.658552	KIF13A	-9.1616	0.066436	0.195787	KIF13A	-16.720	0.024916	0.007198
KITLG	KITLG	0	0.009272	0.923573	KITLG	4.0626	0.012008	0.047369	KITLG	0.990033	0.008171	0.251341	KITLG	-8.544	0.023552	0.017906
LGALS9	LGALS9	11.18816	0.120366	0.31465	LGALS9	-1.73134	0.029988	0	LGALS9	-18.29	0.100738	0	LGALS9	-14.847	0.117069	0.090454
LIG3	LIG3				LIG3				LIG3				LIG3			
MAP2	MAP2				MAP2				MAP2				MAP2			
MAPK10	MAPK10	21.70293	0.178074	0.219028	MAPK10	21.19363	0.065422	0.742365	MAPK10	-14.8981	0.407504	0.831411	MAPK10	-4.279	0.232845	0.748147
MCL1	MCL1	-28.1843	0.011401	0.248411	MCL1	7.054267	0.057402	0.155933	MCL1	57.19903	0.010887	0	MCL1	61.797	0.028825	0
MLH3	MLH3	-3.212	0.040938	0.176546	MLH3	-3.35627	0.098582	0.398158	MLH3	21.62173	0.062271	0.962575	MLH3	27.668	0.051676	0.421192
NAP1L4	NAP1L4	-6.74774	0.043414	0.113057	NAP1L4	3.141	0.019362	0.137281	NAP1L4	-6.50243	0.010945	0.001408	NAP1L4	-2.853	0.010847	0.078514
NDEL1	NDEL1				NDEL1				NDEL1	-15.1348	0.024991	0.00924	NDEL1	-5.930	0.027504	0.000103
PCBP4	PCBP4	1.3239	0.015675	0.403658	PCBP4	5.388167	0.032026	0.041252	PCBP4	0.459067	0.022637	0.49601	PCBP4	1.286	0.043393	0.68878
POGZ	POGZ	-17.004	0.028914	0.363716	POGZ	2.9004	0.044016	0.412742	POGZ	52.50467	0.031242	0	POGZ	43.050	0.041615	0
PPP3CB	PPP3CB	-13.5299	0.044804	0.025142	PPP3CB	-1.32743	0.048447	0.749874	PPP3CB	-27.3462	0.069302	0.008131	PPP3CB	16.731	0.044426	0.007468
RAD17	RAD17				RAD17				RAD17				RAD17			
RBBP8	RBBP8	-26.358	0.0623	0.000736	RBBP8	-6.4777	0.082129	0.349629	RBBP8	-11.2751	0.040926	0.076274	RBBP8	-7.942	0.029391	0.052592
RBM41	RBM41	-32.4329	0.081696	0.0101	RBM41	-10.4344	0.143431	0.177471	RBM41	2.678233	0.050819	0.567804	RBM41	6.082	0.052123	0.056199
RCC1	RCC1	-25.8048	0.080459	0.052071	RCC1	-12.6823	0.100664	0.003265	RCC1	-25.941	0.051376	0.024089	RCC1	-3.592	0.056616	0.509307
RP11	RP11				RP11				RP11				RP11			
SDCCAG8	SDCCAG8	-31.9772	0.051186	0.329179	SDCCAG8	0.798533	0.051408	0.854025	SDCCAG8				SDCCAG8			
SLIT2	SLIT2				SLIT2				SLIT2				SLIT2			
SPTAN1	SPTAN1	2.267433	0.001945	0.004208	SPTAN1	-2.36988	0.00173	0.002756	SPTAN1	-6.2208	0.033042	0.124788	SPTAN1	-0.042	0.013653	0.970173
TNFRSF10B	TNFRSF10B	-0.08447	0.022876	0.964454	TNFRSF10B	-10.0194	0.043296	0.070154	TNFRSF10B	-0.25117	0.025845	0.822386	TNFRSF10B	-7.346	0.02375	0.007324
TSSC4	TSSC4	-23.6618	0.099261	0.075975	TSSC4	-22.8146	0.091151	0.5	TSSC4	-45.1297	0.110674	0.018009	TSSC4	3.815	0.124651	0.683882
UTRN	UTRN	-1.73263	0.019689	0.217341	UTRN	-2.74197	0.015403	0.132323	UTRN	-0.50287	0.065275	0.891155	UTRN	-1.273	0.03184	0.52762

HIEC							HTC 116								
OXALI				STAURO			OXALI				STAURO				
bilan				bilan			bilan				bilan				
Gene	l(OXALI-CT)	St.dev	P values	Gene	STAURO-C	St.dev	P values	Gene	l(OXALI-CT)	St.dev	P values	Gene	STAURO-C	St.dev	P values
AURKA	19.842	0.045918	0.026275	CASC4	10.9533	0.045509	0.040537	AURKA	22.62583	0.045918	0.001471	FGFR1OP	-13.876	0.016129	0.004392
GTF2H2	14.2184	0.057875	0.017009	FGFR1OP	-13.3761	0.03273	0.000966	BCL2L11	22.76133	0.049145	0.004316	KIF13A	-16.720	0.024916	0.007198
CEP170	13.30997	0.042079	0.004616	TNFRSF10i	-10.0194	0.043296	0.070154	DOM3Z	16.49777	0.08546	0.07255	FANCA	12.216	0.009679	0.002543
CASC4	10.43213	0.025841	0.018	AKIP1	-13.597	0.045664	0.013618	CHEK1	-16.8312	0.029632	0.012351	PPP3CB	16.731	0.044426	0.007468
CHEK1	-12.8808	0.042266	0.041437	RCC1	-12.6823	0.100664	0.003265	PPP3CB	-27.3462	0.069302	0.008131	INCENP	-13.678	0.034133	0.026288
PPP3CB	-13.5299	0.044804	0.025142					AKIP1	-19.6121	0.054437	0.016552				
AKIP1	-15.7026	0.037757	0.023499					INCENP	-29.8806	0.020056	0.001151				
INCENP	-16.0287	0.032303	0.001957					ZWINT	-14.7017	0.017962	0.002994				
BCL2L1	-23.8151	0.027383	0.047629					BCL2L1	-25.576	0.05204	0.031058				
RBBP8	-26.358	0.0623	0.000736					CHEK2	-30.5142	0.042508	0.009892				
RBM41	-32.4329	0.081696	0.0101					RCC1	-25.941	0.051376	0.024089				
								BCLAF1	-13.3306	0.056463	0.042651				

Gene	mock DMSO		ICBP112		NVS-1CECR2-1		NVS-1CECR2-1		NVS-1CECR2-1		NVS-1CECR2-1		NVS-1CECR2-1	
	oxali	PSI	oxali	PSI	oxali	PSI	oxali	PSI	oxali	PSI	oxali	PSI	oxali	PSI
AKIP1	49.2247	42.9549	51.339	47.7974	47.7974	2.1143	4.8425	45.5173	56.0958	-6.2698	-3.7074	13.1409		
APAF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ARID4A	0	20.5477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
AURKA	33.3533	45.7409	38.6792	47.0809	47.0809	5.3259	-20.5477	30.742	48.4505	12.3876	-2.6113	-20.5477		
AURKB	43.044	26.3397	19.4081	63.5069	63.5069	-16.7043	37.1672	30.1375	57.8641	-16.7043	-12.9065	2.7096		
AXIN1	19.3012	9.54739	0	10.8266	10.8266	-19.3012	1.27921	17.9578	6.64011	-9.75381	-1.3434	-90.9728		
AXL	0	100	0	100	100	0	-100	0	100	0	0	0		
BCL2L1	93.9243	35.0778	86.5487	25.1864	25.1864	-7.3756	-9.8914	67.5909	53.7948	-58.8465	-26.3384	17.657		
BCL2L11	47.699	59.3263	58.1636	65.5244	65.5244	10.4646	6.2881	45.1728	58.9633	-2.5262	-2.4373	-0.273		
BCLAF1	40.8528	35.4397	36.8817	43.5809	43.5809	-3.9711	8.1412	43.7901	45.9763	-5.4131	2.4373	10.5366		
BCLAF1	48.788	43.4268	50.704	38.2485	38.2485	5.3612	-5.1783	43.7212	37.3312	-5.0668	-5.0668	-6.0956		
BNIP1	0	2.5975	0	2.37505	2.37505	0	-0.22245	0	0	2.5975	0	-2.5975		
BRCA1	83.2656	71.7636	85.6879	67.1544	67.1544	2.4223	-4.6092	83.6445	77.4943	-11.502	0.3789	5.7307		
BRCA1	83.0547	58.1144	86.2603	59.1588	59.1588	3.2056	1.0444	78.0839	70.9654	-24.9403	-4.9708	12.851		
CASC4	33.3526	31.7416	38.0119	31.8912	31.8912	4.6593	0.1486	35.5038	32.7021	-1.611	2.1512	0.9605		
CASP8	85.5173	69.2988	84.8429	73.5796	73.5796	-0.6744	4.2808	88.3826	61.17	-16.2185	2.8653	-8.1288		
CASP9	18.7092	44.0081	26.4275	33.5016	33.5016	7.7183	-10.5065	14.5254	43.9442	25.2989	-4.1838	-0.0939		
CDC25A	67.1562	65.1401	69.03	68.7973	68.7973	1.8738	3.6572	65.9003	67.3065	-2.0161	-1.2559	2.1664		
CDP58	76.3	64.984	79.6918	69.0662	69.0662	3.3918	-5.7836	75.8762	73.5799	-11.316	-0.4238	8.5959		
CEP170	61.513	64.9371	71.1503	59.1535	59.1535	9.6373	3.4241	61.3856	61.5642	3.4241	-0.1274	-3.3729		
CHEK1	74.5657	76.5166	77.1771	75.7921	75.7921	2.6114	-0.7245	69.1204	82.059	1.9509	-5.4453	5.5424		
CHEK2	94.4887	52.3824	90.4478	71.0168	71.0168	-4.0409	18.6344	90.3787	75.7125	-42.1063	-4.11	23.3301		
Dom3z	0	0	0	0	0	0	0	0	91.8833	0	0	91.8833		
ESYT2	28.6982	15.9218	20.6659	17.4637	17.4637	-8.0323	1.5419	22.4484	19.5627	-12.7764	-6.2498	3.6409		
EKO1	0	3.37433	4.59611	2.57147	2.57147	4.59611	-0.80286	2.74959	3.37433	2.74959	2.74959	-3.37433		
F3	78.1837	87.0869	82.3992	79.0999	79.0999	4.2155	-7.987	68.4303	73.475	8.9032	-9.7534	-13.6119		
FANCA	68.7604	58.0455	60.7046	54.5003	54.5003	-8.0558	-3.5452	50.6865	60.0986	-10.7149	-18.0739	2.0531		
FATK	82.404	90.1449	86.6061	82.9005	82.9005	4.2021	-7.2444	61.9002	83.6656	7.7409	-20.5038	-6.4793		
FGFR1OP	37.5783	18.4544	24.9562	20.6574	20.6574	-12.6221	2.203	33.4045	19.5677	-19.1239	-4.1738	1.1133		
FOXM1	39.7373	56.6292	55.8891	63.0251	63.0251	16.1518	6.3959	41.6387	64.7246	16.8919	1.9014	8.0954		
FN1	0	3.43041	0	3.43041	3.43041	0	-3.43041	0	0	3.43041	0	-3.43041		
GPR137	93.0327	59.7672	100	72.2543	72.2543	6.9673	12.4871	95.0992	67.6272	-33.2655	2.0665	7.86		
GTZH2	5.65705	14.5287	30.0001	15.4593	15.4593	24.34305	0.9306	7.26179	13.1421	8.87165	1.6074	-1.3866		
INCEP1	53.6385	25.8406	34.2914	30.6282	30.6282	-19.3471	4.7876	52.0361	26.5634	-27.7979	-1.6024	0.7228		
KIF13A	55.9918	10.4334	40.827	24.9514	24.9514	-15.1648	14.518	53.1167	38.9888	-45.5584	-2.8751	28.5554		
KITLG	26.3993	43.5755	34.7116	43.8942	43.8942	8.3123	0.3187	29.2472	47.1652	17.1762	2.8479	3.5897		
LGALS9	100	100	60.9957	89.5637	89.5637	-39.0043	-10.4963	33.9124	47.7881	0	-66.0876	-52.2419		
LIG3	100	100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0		
MAP2	55.529	22.442	31.2396	24.7918	24.7918	-24.2894	2.3498	54.3161	26.8542	-33.087	-1.2129	4.4122		
MAPK10	90.5827	83.4158	83.5632	63.4406	63.4406	-7.0195	-19.9752	85.4427	83.1697	-7.1669	-5.14	-0.2461		
MCL1	69.9327	75.1422	60.26	73.3035	73.3035	-9.6727	-1.8387	60.9025	83.8104	5.2095	-9.0302	8.6682		
MLH3	63.447	58.0345	53.175	68.5864	68.5864	-10.272	10.5519	62.2325	81.4636	-5.4125	-1.2145	23.4791		
NAP1L4	24.1956	12.6804	14.6487	0	0	-12.6804	-12.6804	21.8725	19.0549	-11.5152	-2.3231	6.3745		
NDEL1	30.3695	22.1135	26.8852	23.4997	23.4997	-3.4843	1.3862	39.0528	26.5182	8.256	8.6833	4.4047		
PCBP4	79.5202	84.0719	92.3644	85.381	85.381	12.8442	1.3691	74.708	89.7204	4.4917	-4.7522	5.7085		
POGZ	36.7975	46.1847	52.916	45.4255	45.4255	16.1185	-0.7592	37.7657	47.0918	9.3872	0.9682	0.9071		
PPP3CB	69.9022	71.2788	76.3607	80.2714	80.2714	6.4585	8.9926	73.5405	85.9463	3.766	3.6383	14.6675		
RBBP8	64.8915	37.1527	51.941	38.5001	38.5001	-12.9505	1.3474	61.4819	42.3841	-27.7388	-3.4096	5.2314		
RRM1	32.4735	10.9958	34.4516	9.57497	9.57497	1.9781	-1.42083	31.8644	9.41985	-21.4777	-0.6091	-1.57595		
RCC1	73.3788	70.1165	69.153	68.329	68.329	-4.2258	-1.7875	75.768	59.662	-3.2623	2.3802	-10.4523		
SDCCAG8	77.5634	64.1071	83.2575	74.0461	74.0461	5.6941	9.899	70.3037	74.6988	-13.4563	-7.2597	10.5427		
SLIT2	100	100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0		
SPTAN1	49.4791	33.3499	50.5026	38.0319	38.0319	1.0255	4.682	46.1694	42.084	-16.1292	-3.3097	8.7341		
TNFRSF10B	35.7956	45.5261	31.7287	39.7125	39.7125	-4.0669	-5.8136	30.9909	49.7112	9.7305	-4.8047	4.1851		
TSSC4	85.7304	53.2116	59.2165	45.2353	45.2353	-26.5139	-7.9763	81.1779	48.2339	-32.5188	-4.5275	-4.9777		
UTRN	92.1222	89.8817	75.9098	84.9158	84.9158	-16.2124	-4.9659	87.7552	79.2852	-2.2405	-4.367	-10.5965		
ZWINT	68.1384	54.1199	58.8272	41.1197	41.1197	-9.3112	-13.0002	68.0265	6.05748	-14.0185	-0.1119	-48.06242		

Gene	mock DMSO		PEI-3		GSK484		PEI-3		GSK484		GSK484		cut-off PSI: > 10		cut-off PSI: > 10	
	DMSO	oxall DMSO	PSI (OXALI-CTRL)	PSI (COMP-CTRL)	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))	GSK484	oxall GSK484	PSI (OXALI-CTRL)	PSI (COMP-CTRL)	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))	GSK484	oxall GSK484	PSI (OXALI-CTRL)	PSI (COMP-CTRL)	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))
AKIP1	49.2247	42.9549	45.3041	47.7236	-3.9206	4.7687	42.8235	49.3542	-6.2698	0	0	0	-6.4012	6.3993	0	
APAF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ARID4B	0	20.5477	0	0	0	-20.5477	0	0	0	0	0	0	0	-20.5477	0	
AURKA	33.3533	45.7409	27.0626	46.3411	-6.2907	0.6002	54.0158	47.0261	-12.3876	0	0	0	20.5477	12.3876	20.6625	
AURKB	43.0444	26.3397	34.6464	30.5666	-8.3976	4.2263	81.2576	84.0541	-16.7043	0	0	0	-16.7043	38.2136	1.2852	
AXIN1	19.3072	9.50739	10.2357	18.0129	-9.0655	8.46551	0	17.0063	-9.75381	0	0	0	-19.3012	57.7144	7.45891	
AXL	0	100	100	100	100	-100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	
BCL2L1	93.9243	50.0778	81.4064	39.4361	-12.5179	4.3583	0	22.2512	-58.8465	0	0	0	-93.9243	-12.8266	0	
BCL2L11	47.6999	59.2363	43.4841	64.9448	-11.5373	5.7085	45.9218	59.4494	-11.5373	0	0	0	-11.5373	0.2131	0	
BCLAF1	40.8528	35.4397	41.1249	44.3942	-5.4131	0.2721	52.9655	47.6309	-5.4131	0	0	0	12.1127	12.1912	0	
BCLAF1	48.788	43.268	38.006	37.5366	-5.3612	-5.8832	43.5838	41.9903	-5.3612	0	0	0	-5.2042	-1.4365	0	
BNIP1	0	2.5975	2.88763	1.75283	2.88763	-0.84467	0	2.37079	2.5975	0	0	0	0	-0.22671	0	
BRCA1	83.2656	71.636	84.3542	75.7412	-11.502	3.9776	83.2573	69.5149	-11.502	0	0	0	-11.502	-0.0083	-2.2487	
BRCA1	83.0547	58.1144	76.7076	53.9064	-24.9403	-4.208	74.6252	74.6252	-24.9403	0	0	0	-8.4295	-5.7497	0	
CASC4	33.3526	31.7416	34.6872	32.4082	1.3346	0.6666	33.2483	32.7581	-1.611	0	0	0	-0.1043	1.0165	0	
CASP8	85.5173	69.2988	85.6619	61.854	-16.2185	-7.4448	79.4053	69.9524	-16.2185	0	0	0	-6.112	0.6536	0	
CASP9	18.7092	44.0081	10.3247	44.0251	25.2989	0.017	33.6837	40.9413	25.2989	0	0	0	14.9745	-3.0668	0	
CDC25A	67.1562	65.1401	66.4434	65.6032	-2.0161	0.4631	66.4886	65.4808	-2.0161	0	0	0	-0.6676	0.3407	0	
CDC25B	76.3	64.984	78.1822	63.8223	-11.316	-1.1617	81.9114	66.0606	-11.316	0	0	0	5.6114	1.0766	0	
CEP170	61.513	64.9371	59.6719	65.9696	3.4241	1.0325	77.7209	58.42	16.2079	0	0	0	16.2079	-6.5171	0	
CHEK1	74.5657	76.5166	69.5718	81.6767	-1.9509	-4.9939	74.5144	75.5853	-1.9509	0	0	0	-0.0513	-0.9313	0	
CHEK2	94.4887	52.3824	91.0772	72.1172	-42.1063	19.7896	93.625	69.2482	-42.1063	0	0	0	-0.8637	16.8658	0	
Dom3z	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ESYT2	28.6982	15.9218	24.7589	17.1189	-3.9393	1.1971	38.7799	18.5201	-12.7764	0	0	0	10.0817	2.5983	0	
EXO1	0	3.37433	1.63349	4.89649	1.63349	1.52216	0	2.40911	3.37433	0	0	0	0	-0.96522	0	
F3	78.1837	87.0869	79.6296	82.5079	8.9032	-4.579	58.2602	77.188	-9.9235	0	0	0	-19.9235	-9.8889	0	
FANCA	68.7604	58.0455	58.3861	63.2326	-10.7149	5.1871	60.9181	62.8091	-10.7149	0	0	0	-7.8423	4.7636	0	
FASTK	82.404	90.1449	84.5613	82.5509	7.7409	-7.594	87.4525	83.0977	7.7409	0	0	0	5.0485	-7.0472	0	
FGFR1OP	37.5783	18.4544	35.5941	19.3531	-19.1239	0.8987	38.6571	20.6342	-19.1239	0	0	0	1.0788	2.1798	0	
FOXO1	39.7373	56.6292	40.1819	60.5575	16.8919	3.9283	48.9906	57.3745	16.8919	0	0	0	9.2533	0.7453	0	
FYN	0	3.43041	0	0	-3.43041	0	0	0	0	0	0	0	0	-3.43041	0	
GPR137	93.0327	59.7672	79.0393	60.0894	-33.2655	0.3222	69.635	69.9537	-33.2655	0	0	0	-23.3977	10.1865	0	
GT2H2	5.65705	14.5287	7.74335	14.995	8.87165	0.4708	4.68703	11.117	8.87165	0	0	0	-0.97002	-3.4117	0	
INCEP1	53.6385	25.8406	50.541	31.9815	-27.7979	6.1409	36.0104	31.6137	-27.7979	0	0	0	-17.6281	5.7731	0	
KIF13A	55.9918	10.4334	61.0671	26.1033	-45.5584	15.6699	72.6645	28.4245	-45.5584	0	0	0	16.6727	17.9911	0	
KITLG	26.3993	43.5755	26.0076	51.2369	17.1762	7.6614	32.6918	49.3962	17.1762	0	0	0	6.2925	5.8207	0	
LGALS9	100	100	63.2387	100	-36.7613	0	0	69.3248	0	0	0	0	-100	-30.6752	0	
LIG3	100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	
MAP2	55.529	22.442	52.1017	17.4066	-33.087	-5.0414	51.8088	22.4191	-33.087	0	0	0	-3.7202	-0.0229	0	
MAPK10	90.5827	83.4158	83.159	75.5184	-7.1669	-7.8974	100	77.3279	-7.1669	0	0	0	9.4173	-6.0879	0	
MCL1	69.9327	75.1422	63.5068	80.5188	5.2095	5.3766	63.0846	71.3921	5.2095	0	0	0	-6.8481	-3.7501	0	
MLH3	63.447	58.0345	77.454	59.0601	-5.4125	14.007	26.8198	67.8887	-5.4125	0	0	0	-36.6272	9.8542	0	
NAP1L4	24.1956	12.6804	16.6173	14.2212	-11.5152	1.5408	12.2408	13.2284	-11.5152	0	0	0	-11.9548	0.548	0	
NDEL1	30.3695	22.1135	46.1698	30.7884	-8.256	8.6749	31.7158	31.5921	-8.256	0	0	0	1.3463	9.4786	0	
PCBP4	79.5202	84.0119	78.9279	93.5617	4.4917	9.5498	100	85.1109	4.4917	0	0	0	20.4798	1.099	0	
POGZ	36.7975	46.1847	38.8225	57.0723	9.3872	10.8876	28.2444	44.243	9.3872	0	0	0	-8.5531	-1.9417	0	
PPP3CB	69.9022	71.2788	75.1712	78.9699	1.3766	7.6911	64.0831	82.1415	1.3766	0	0	0	-5.8191	10.8627	0	
RBBP8	64.8915	37.1527	59.0853	55.3046	-27.7388	-5.8062	61.1585	42.1926	-27.7388	0	0	0	-3.733	5.0399	0	
RBM41	32.4735	10.9958	32.4695	9.82095	-21.4777	-1.17485	29.3904	13.6783	-21.4777	0	0	0	-3.0931	2.6825	0	
RCM1	73.3788	70.1165	70.6503	68.7717	-3.2623	-3.2623	54.6087	67.7923	-3.2623	0	0	0	-18.7701	-2.3242	0	
SDCCAG8	77.5634	64.1071	82.674	70.2166	-13.4563	6.1095	87.3234	65.8465	-13.4563	0	0	0	9.76	1.7394	0	
SLIT2	100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	
SPTAN1	49.4791	33.3499	46.2183	39.3808	-16.1292	6.0309	52.9373	40.3845	-16.1292	0	0	0	3.4582	7.0946	0	
TNFRSF10B	35.7956	45.5261	30.9844	0	-45.5261	-4.8112	41.0451	42.69	-45.5261	0	0	0	5.2495	-2.8361	0	
TSSC4	85.7304	53.2116	86.5762	49.6609	-32.5188	0.8458	90.2881	41.9314	-32.5188	0	0	0	4.5577	-11.2802	0	
UTRN	92.1222	89.8817	92.0567	86.7795	-2.2405	-0.0655	83.2099	93.0415	-2.2405	0	0	0	-8.9123	3.1598	0	
ZWINT	68.1384	54.1199	71.0141	50.8581	-14.0185	-3.2618	72.9306	44.7697	-14.0185	0	0	0	4.7922	-9.3502	0	

Gene	JQ1										GSKK2801									
	mock	DM50	oxali	JQ1	PSI (OXALI-CTRL)	PSI (COMP-CTRL)	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))	GSKK2801	GSKK2801 oxali	PSI (OXALI-CTRL)	PSI (COMP-CTRL)	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))	mock	DM50	oxali	JQ1	PSI (OXALI-CTRL)	PSI (COMP-CTRL)	PSI ((COMP+OXALI)-(OXALI))	
AKIP1	49.2247	42.9549	0	35.7337	47.4493	-6.2698	4.4944	38.2197	59.4957	-6.2698	-11.005	16.5408								
APAF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
ARID4B	0	20.5477	0	0	20.5477	0	-20.5477	35.8858	0	20.5477	35.8858	-20.5477								
AURKA	33.3533	45.7409	0	24.9857	58.1856	-8.3676	12.4447	28.8459	63.3494	12.4447	-4.5074	17.6085								
AURKB	43.004	26.3397	0	50.9431	-16.7043	-83.044	24.6034	29.3177	0	-16.7043	-13.7263	-26.3397								
AXIN1	19.3012	9.54739	0	37.2588	12.3733	-9.75381	2.82591	0	-9.75381	-9.75381	-19.3012	-9.54739								
AXL	0	100	0	0	100	0	-100	0	0	100	0	-100								
BCL2L1	93.9243	35.0778	0	100	34.951	-58.8465	0.1268	93.3326	0	-58.8465	-0.5917	-35.0778								
BCL2L11	47.699	59.2363	0	47.699	64.7571	11.6603	5.208	51.108	82.7648	11.5373	3.409	23.5285								
BCLAF1	40.8528	35.4397	0	48.5032	34.191	-5.4131	1.2487	42.2445	42.2445	-5.4131	4.4255	6.8048								
BNIPL1	88.788	49.4268	0	39.4297	47.6786	-5.3612	4.2518	43.1584	43.3574	-5.3612	-5.6296	-0.0694								
BRCA1	83.2656	71.7634	0	2.90703	2.5975	0	0.30953	0	0	2.5975	0	-2.5975								
BRCA1	83.0547	58.1144	0	85.3592	64.3661	-11.502	2.0936	88.1677	76.1099	-11.502	4.9021	4.3463								
CASC4	33.3526	31.7416	0	94.6257	56.054	-24.9403	11.571	76.8259	76.0733	-24.9403	-6.2288	17.9589								
CASP8	85.5173	69.2988	0	37.3266	38.9428	-1.611	7.2012	34.5747	50.8887	1.611	1.2221	19.1471								
CASP9	18.7092	44.0081	0	89.0688	80.7904	-16.2185	11.4916	86.6399	60.1321	-16.2185	1.1226	-9.1667								
CDC25A	67.1562	65.1401	0	15.6501	38.1822	25.2989	-5.8259	5.11865	0	25.2989	-13.59055	-44.0081								
CDC25B	76.3	64.984	0	67.7356	73.0241	-2.0161	7.884	66.5207	67.9032	-2.0161	-0.6355	2.7631								
CEP170	61.513	64.9371	0	75.3058	80.3129	-0.9942	15.3289	75.5313	58.0882	-11.316	-0.7687	-6.8958								
CHK1	74.5657	76.5166	0	66.6998	62.4999	3.4241	-2.4372	62.9475	3.4241	-2.4372	1.4345	7.0761								
CHK2	94.4887	52.3824	0	70.1299	85.8192	-4.4358	9.3026	63.041	88.7927	1.9509	-11.5247	12.2761								
Dom3z	0	0	0	91.7458	49.4825	-2.7429	-2.8999	91.6395	80.2612	-42.1063	-2.8492	27.8788								
ESYT2	28.6992	15.9218	0	27.0106	14.2737	-1.6481	-1.6481	23.7114	35.9372	-12.7764	-4.9868	20.0154								
EXO1	0	3.37433	0	2.96625	5.25214	2.96625	1.87781	2.55834	0	3.37433	2.55834	-3.37433								
F3	78.1837	87.0869	0	61.037	91.3031	8.9032	4.2162	65.8945	100	8.9032	-12.2892	12.9131								
FANCA	68.7604	58.0455	0	58.7479	55.9437	-10.7149	-10.7149	61.6828	75.0224	-10.7149	-7.0776	16.9769								
FATK	82.404	90.1449	0	100	93.0761	7.7409	2.9312	73.0729	7.7409	7.7409	-9.3311	-90.1449								
FGFR1OP	37.5793	18.4544	0	33.9339	20.764	-3.6444	2.3096	32.1816	19.5274	-19.1239	-5.3967	1.073								
FOXM1	39.7373	56.6292	0	4.95742	60.6839	-34.77988	4.0547	41.1045	68.2143	16.8919	1.6772	11.5851								
FYN	0	3.43041	0	0	5.26273	0	1.83232	0	0	3.43041	0	-3.43041								
GPR137	93.0377	59.7672	0	100	83.5781	-33.2655	6.9673	80.781	100	-33.2655	-12.2517	40.2328								
GTF2H2	5.65705	14.5287	0	3.95323	21.5374	-2.30382	7.0087	6.69375	4.97604	8.87165	10.367	-9.55266								
INGENP	53.6385	25.8406	0	42.0299	21.5444	-11.6086	-4.2962	50.8718	32.3096	-27.7979	-2.9667	6.469								
KIF13A	55.9918	10.4334	0	47.994	10.3634	-45.5584	-0.07	58.8492	26.4236	-45.5584	2.8574	15.9902								
KITLG	26.3993	43.5755	0	38.6272	59.6907	17.1762	16.1152	27.7395	51.3983	17.1762	1.3402	7.8228								
LGALS9	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	-100	-100								
LIG3	100	100	0	100	100	0	0	100	100	0	0	0								
MAP2	55.529	22.442	0	48.9188	32.4062	-6.6402	9.9642	48.0052	30.8215	-33.087	-6.5238	8.3795								
MAPK10	90.5827	83.4158	0	73.583	100	-16.9997	16.5842	82.7898	0	-16.9997	-7.7929	-83.4158								
MCL1	69.9327	75.1422	0	64.8108	74.4051	5.2095	-0.7371	54.0829	81.0589	5.2095	-15.8498	5.9167								
MLH3	63.447	58.0345	0	62.5726	62.8205	-0.8744	4.786	68.1553	0	-5.4125	4.7083	-58.0345								
NAP1L4	24.1956	12.6804	0	37.2346	16.2468	-6.961	-4.029	20.2442	18.3008	-11.5152	-3.9514	-9.5998								
NDEL1	30.3695	22.1135	0	33.2844	18.0845	-8.256	2.9149	35.2234	12.5137	-8.256	4.8539	5.6204								
PCBP4	79.5702	84.0119	0	64.5743	86.3581	4.4917	2.3462	100	100	4.4917	20.4798	15.9881								
POZ2	36.7975	46.1847	0	47.1942	56.0751	9.3872	9.8904	38.2255	62.9275	9.3872	1.428	16.7428								
PPP3CB	69.9022	71.2788	0	75.8107	80.4397	1.3766	9.1609	77.5624	75.7359	1.3766	7.6602	4.4571								
RBBP8	64.8915	37.1527	0	65.7471	29.5373	-27.7388	-7.6154	57.6937	58.7492	-27.7388	-7.1978	21.5965								
RBM41	32.4755	10.9958	0	23.2812	10.0666	-21.4777	-0.9292	25.1484	10.8128	-21.4777	-7.3251	-0.183								
RCCL1	73.3788	70.1165	0	64.1233	60.5672	-3.2623	0.7445	77.7266	72.4976	-3.2623	4.3478	2.3811								
SDCCAG8	77.5634	64.1107	0	62.0962	81.4657	-13.4563	-15.4672	84.2703	92.4088	-13.4563	6.7069	28.3017								
SLIT2	100	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0								
SPTAN1	49.4791	33.3499	0	51.3732	37.2506	1.8941	3.9007	40.3694	55.6345	-16.1292	-9.1097	22.2846								
TNFRSF10B	35.7956	45.261	0	26.3665	30.6106	9.7505	-14.9155	29.1532	55.8895	9.7505	-6.6424	8.3654								
TSSCA	85.7304	53.2116	0	58.796	28.1131	-32.5188	-25.0985	66.7104	33.5191	-32.5188	-19.02	-19.6925								
UTRN	92.1222	89.8817	0	88.9086	67.6387	-2.2405	-3.2136	84.2635	79.3243	-2.2405	-7.8587	-10.5574								
ZWINT	68.1384	54.1199	0	70.7499	32.3934	-14.0185	-21.7265	63.6243	63.9426	-14.0185	-4.5141	9.8227								