



La surexpression de p21^{WAF1/CIP1} via CUGBP1 et les Granules de Stress procurent une résistance aux cellules cancéreuses face à l'apoptose médiée par le Bortézomib.

Thèse

Cristina Gareau

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Cristina Gareau, 2016

Résumé

Raisonnement: Les mécanismes post-transcriptionnels occupent une place importante au sein de la régulation de l'expression génique. L'expression génique est cruciale au bon développement de la cellule, mais également à sa survie. L'altération des mécanismes post-transcriptionnels fait maintenant l'objet de nombreuses études sur la cause ou la conséquence de différentes pathologies humaines telles que le cancer. Récemment, les Granules de Stress (GS) ont été trouvées à agir comme un nouveau mécanisme post-transcriptionnel, qui permet à la cellule de survivre en conditions de stress.

Résultats: Notre étude démontre pour la première fois, la formation de GS dans les cellules cancéreuses traitées avec un agent chimiothérapeutique. De cela, nous avons élucidé un sentier spécifique de formation des GS en réponse au Bortézomib (Bz). Nous avons montré que cet inhibiteur de protéasome réduit l'initiation de la traduction via la phosphorylation du facteur de l'initiation de la traduction (eIF2 α). Cette phosphorylation d'eIF2 α se produit via l'activation de la kinase de stress HRI (Heme-Regulated kinase). La suppression de la voie de phosphorylation d'eIF2 α -GS via la déplétion de HRI favorise une mort cellulaire accrue chez les cellules cancéreuses traitées au Bz. Ces données révèlent donc un rôle important pour HRI dans la résistance des cellules cancéreuses face au Bz, en partie par l'entremise de sa capacité à réguler la formation de GS. Pour faire suite à cette étude, nous décrivons que le facteur anti-apoptotique p21 est séquestré à l'intérieur des GS qui sont induites par le Bz. L'emprisonnement de l'ARNm p21, hautement instable, à l'intérieur des GS permet à cet ARNm d'être protégé, stabilisé et donc accumulé. Nous démontrons que la protéine de liaison à l'ARN, CUGBP1, est responsable de la localisation de l'ARNm p21 à l'intérieur des GS en réponse au Bz. Après un traitement prolongé de Bz, les GS sont désassemblées et ainsi relâchent une grande quantité d'ARNm p21 qui devient alors disponible pour être traduite. Cette traduction massive de p21 apporte alors un élan anti-apoptotique à la cellule cancéreuse ce qui lui permet de survivre au traitement chimiothérapeutique de Bz.

Conclusions et perspectives: En somme, ces études décrivent une nouvelle voie spécifique de survie cellulaire qui implique un rôle potentiel pour les GS dans le cancer et qui pourrait être ciblée en thérapie. En perspective, des tumeurs xéno greffes chez la souris seront utilisées pour tester si (i) la suppression des GS via l'inactivation de HRI, et (ii) l'inactivation de la voie CUGBP1-p21, qui est régulée par les GS, sensibiliseraient les tumeurs au Bz, validant ainsi notre modèle in vivo. Ces études apporteraient des preuves de concept pour le développement de nouvelles stratégies ciblant les voies associées au GS et qui pourraient être utilisées en thérapie combinatoire pour diminuer le risque de résistance face au traitement de Bz.

Abstract

Rationale: Post-transcriptional mechanisms play an important role in the regulation of gene expression. Gene expression is crucial for the proper development of the cell but also for its survival. The alteration of post-transcriptional mechanisms is now the subject of numerous studies on the cause, or on the consequence, of various human diseases such as cancer. Recently, Stress Granules (SG) have been found to act as a new post-transcriptional mechanism, which allows the cell to survive in stress conditions.

Results: Our study demonstrates for the first time, the formation of SGs in cancerous cells, in response to a chemotherapeutic agent. From this we have elucidated a specific pathway of SG formation in response to Bortezomib (Bz). We demonstrate herein that this proteasome inhibitor reduces translation initiation via the phosphorylation of the initiation factor (eIF2 α). This phosphorylation of eIF2 α is controlled through the activation of the heme-regulated kinase (HRI). The alteration of the pathway phospho-eIF2 α -SG, through depletion of HRI, causes massive cellular death in Bz treated cancerous cells. These data thus reveal a crucial role for HRI in the resistance of cancerous cells against Bz, in part via its capacity to regulate SG formation. Furthermore, we describe the anti-apoptotic factor p21 to be trapped inside Bz-SGs. This sheltering of the highly unstable p21 mRNA allows this one to be protected from degradation, which can be stabilized and accumulated. We also demonstrate, herein, that the RNA-binding protein CUGBP1 acts as a factor responsible for the localization of the p21 mRNA inside Bz-SGs. After prolonged treatment of Bz, SGs disassemble and release a high dose of p21 mRNA that becomes available for translation. This massive translation of anti-apoptotic p21 gives a boost to the cell that allows it to survive the stress.

Perspectives and Conclusion: In sum, our studies describe a new specific pathway of cell survival that implies a potential role for SGs in cancer, which could be targeted in therapy. In perspective, xenograft tumors in mice will be used to test if (i) the inhibition of SG formation via the inactivation of HRI, and (ii) the inactivation of the CUGBP1-p21 pathway that is regulated by SGs, can both sensitize tumors to Bz treatment thus validating our model *in vivo*. These studies will provide us with a proof of principle for the development of new strategies targeting SG-associated pathways. Combinatorial therapies implicating the termination of such pathways could be developed in order to reduce the risk of recurrence against Bz.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS	XIX
AVANT-PROPOS	XXI
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE SUR LA RÉPONSE AU STRESS ET SON IMPLICATION DANS LE CANCER	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Les protéines de liaison à l'ARN.....	3
1.3. Les granules à ARN	3
1.3.1. Les granules de stress	6
1.3.1.1. La formation des granules de stress	6
1.3.1.2. Composition et caractéristiques des granules de stress	9
Composition.....	9
Dynamique.....	9
Importance pathologique	10
1.4. Le cancer et la chimiorésistance	11
1.4.1. Le cancer	11
1.4.1.1. L'implication des gènes dans le cancer	12
1.4.1.2. Les caractéristiques du cancer	13
1.4.1.3. Les types de cancers et leurs classifications	14
1.4.1.4. La stadification du cancer.....	16
1.4.1.5. Le traitement du cancer et ses avancements.....	17
1.4.2. Le protéasome et son implication dans le cancer.....	18
1.4.2.1. Le protéasome.....	18

1.4.2.2.	La voie ubiquitine-protéasome	19
1.4.2.3.	Les inhibiteurs de protéasome	22
1.5.	La kinase « Heme-Regulated inhibitor » (HRI)	26
1.6.	L'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21^{WAF1/CIP1}	28
1.6.1.	Le contrôle transcriptionnel de p21 ^{WAF1/CIP1} et sa relation avec p53	28
1.6.2.	L'expression et la stabilisation de l'ARNm p21 ^{WAF1/CIP1}	29
1.7.	CUGBP1 (CELF1)	30
2.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	33
3.	RÉSULTATS	35
3.1.	The Chemotherapeutic Agent Bortezomib Induces the Formation of Stress Granules	35
3.1.1.	Avant-Propos	38
3.1.2.	Résumé	38
3.1.3.	Abstract	38
3.1.4.	Background	39
3.1.5.	Results	41
3.1.6.	Discussion	48
3.1.7.	Conclusions	50
3.1.8.	Methods	50
3.1.9.	Aknowledgements	52
3.1.10.	References	52
3.2.	p21^{WAF1/CIP1} Upregulation through the Stress Granule-Associated Protein CUGBP1 Confers Resistance to Bortezomib-Mediated Apoptosis	57
3.2.1.	Avant-Propos	60
3.2.2.	Résumé	60
3.2.3.	Abstract	60
3.2.4.	Introduction	61
3.2.5.	Results	63
3.2.6.	Discussion	75
3.2.7.	Conclusions	78
3.2.8.	Materials and Methods	79
3.2.9.	Supporting Information	83
3.2.10.	Acknowledgments	88
3.2.11.	Footnotes	88
3.2.12.	References	89
4.	DISCUSSION	95
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	109

6. BIBLIOGRAPHIE	111
ANNEXES.....	125
Annexe 1 Tableau du contenu des Granules de Stress	125
Annexe 2 Publications.....	128
Annexe 2.1 Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in Drosophila	128
Annexe 2.2 Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein Recruitment and Dynamics in <i>Drosophila</i> Stress Granules.....	129
Annexe 2.3 Direct binding of the <i>Alu</i> binding protein dimer SRP9/14 to 40S ribosomal subunits promotes stress granule formation and is regulated by <i>Alu</i> RNA	130
Annexe 2.4 Inactivation of the mTORC1-Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Pathway Alters Stress Granule Formation.....	131
Annexe 2.5 UVC-Induced Stress Granules in Mammalian Cells	132

Liste des Figures

Figure 1-1 Les processus de l'expression génique.....	2
Figure 1-2. Structure du neurone classique, et localisation des granules neuronales.....	5
Figure 1-3 L'initiation de la traduction.....	7
Figure 1-4 Les Caractéristiques du Cancer.....	14
Figure 1-5 Les types de cancers fréquents.....	16
Figure 1-6 Schéma de la particule catalytique (20S) du protéasome.....	18
Figure 1-7 Le Protéasome 26S.....	19
Figure 1-8 La voie Ubiquitine-Protéasome (UPP).....	21
Figure 1-9 Structure cristalline de la sous-unité $\beta 5$ accompagnée de ses sites de mutations inhibant la liaison au Bortézomib.....	24
Figure 1-10 Résumé des mécanismes de résistance au Bortézomib.....	25
Figure 1-11 Les domaines de liaison à l'hème de la protéine HRI.....	26
Figure 1-12 Domaines et sites de phosphorylation de la kinase HRI.....	27
Figure 1-13 Schéma des domaines fonctionnels et des sites de phosphorylation de CUGBP1.....	31
Figure 3-1 Bortezomib induces SG formation.....	42
Figure 3-2 Reducing HRI levels by siRNA prevents bortezomib-induced SGs formation.....	44
Figure 3-3 Reducing HRI levels by siRNA promotes bortezomib-mediated apoptosis.....	45
Figure 3-4 The formation of SGs correlates with resistance to bortezomib-mediated apoptosis.....	47
Figure 3-5 Bortezomib upregulates p21 mRNA expression.....	65
Figure 3-6 The accumulation of p21 mRNA following bortezomib treatment involves its stabilization and correlates with its segregation in SG.....	68
Figure 3-7 CUGBP1 binds to p21 mRNA and promotes its accumulation and expression upon bortezomib treatment.....	71
Figure 3-8 Reducing CUGBP1 levels prevents bortezomib-mediated p21 mRNA stabilization and accumulation in SG.....	72
Figure 3-9 p21 depletion promotes bortezomib-mediated apoptosis.....	74
Figure 3-10 Time course analysis of SG formation and p21 expression during bortezomib treatment.....	83
Figure 3-11 Bortezomib upregulates p21 mRNA expression in different cancer cells.....	84
Figure 3-12 Expression profile of proteasome substrates during bortezomib treatment.....	84
Figure 3-13 Prolonged treatment with bortezomib induces a redistribution of the p21 mRNA in the cytoplasm and nuclei.....	85
Figure 3-14 HRI depletion prevents bortezomib-induced SG formation and p21 mRNA accumulation.....	86
Figure 3-15 CUGBP1 depletion does not affect the steady-state level of the p21 mRNA in SG-free conditions tested.....	87
Figure 3-16 CUGBP1 depletion does not affect GAPDH mRNA localization in SG.....	88
Figure 4-1 La voie anti-apoptotique médiée par l'ARNm p21, CUGBP1, et les GS en réponse au Bortézomib.....	96
Figure 4-2 La déplétion d'HRI diminue le développement tumoral chez les tumeurs xénotransplantées d'embryon de poulet.....	100
Figure 4-3 Schématisation de l'hypothèse par laquelle CUGBP1 recruterait l'ARNm p21 à son site de transcription dans le noyau.....	103
Figure 4-4 Schématisation hypothétique d'une structure des GS.....	107

Liste des abréviations

(ADN) Acide désoxyribonucléique

(Alu) *Arthrobacter luteus*

(ARN) Acide ribonucléique

(ARNm) Acide ribonucléique messenger

(ASK1) *Apoptosis Signal-Regulating kinase 1*

(ATF5) *Activating Transcription Factor 5*

(ATM) *Ataxia telangiectasia mutated*

(ATR) *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*

(Bz) Bortézomib

(CAM) Membrane chorioallantoïque

(CDK) *Cyclin-Dependent kinase*

(CDKN1A) *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*

(CELF1) *CUGBP Elav-like Family member 1*

(CFI) *Canadian Foundation for Innovation*

(CHIP-CLIP) *Microarray RNA immunoprecipitation*

(CHUQ) Centre Hospitalier Universitaire du Québec

(CIHR) *Canadian Institutes of Health Research*

(CLIP) *Cross-Linking ImmunoPrecipitation*

(CML) *Chronic Myeloid Leukemia*

(CP) *Particule catalytique/Catalytic Particle*

(CRSFA) Centre de Recherche de l'hôpital Saint-François d'Assise

(CRT) *Calreticulin*

(CUGBP1) *CUG triplet repeats Binding Protein 1*

(DAPI) *4',6-diamidino-2-phenylindole*

(dFMRP) *drosophila FMRP*

(DM1) *Myotonic Dystrophy type 1*

(DM2) *Myotonic Dystrophy type 2*

(DMEM) *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

(DNA) *Deoxyribonucleic Acid*

(ROS) *Dérivés réactifs de l'Oxygène/Reactive Oxygen Species*

(EFNA1) *Ephrin-A1*

(eIF) *Eukaryotic Initiation Factor*

(FACS) *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

(FBS) *Fetal Bovine Serum*

(FDA) *Food and Drug Administration*

(FGF2) *Fibroblast Growth Factor 2*

(FISH) *Fluorescence In Situ Hybridization*

(FITC) *Fluorescent isothiocyanate*

(FMRP) *Fragile-X Mental Retardation Protein*

(FRAP) *Fluorescence recovery after photobleaching*

(FRSQ) *Fonds de Recherche en Santé du Québec*

(FXR1) *Fragile X Mental retardation syndrome-Related Protein 1*

(G3BP) *Ras GTPase-activating protein-Binding Protein 1*

(GA) Geldanamycine

(GCN2) *General Control Nonderepressible 2*

(GCS) *Germline Cell Stem*

(GDP) *Guanosine diphosphate*

(GFP) *Green Fluorescence Protein*

(GN) Granule neuronale

(GRE) *GU-Rich Element*

(GS) Granule de Stress

(GTP) *Guanosine-5'-triphosphate*

(GUVVC) Granules Ultra-Violet-C

(HITS-CLIP) *High-throughput sequencing-CLIP*

(HRI) *Kinase régulée par l'Hème/Heme Regulated Inhibitor kinase*

(HRM) *Heme Regulated Motif*

(HuR) *Human antigen R*

(iCLIP) *individual CLIP*

(IFs) Immunofluorescences

(IGF-1) *Insulin-like Growth Factor*

(IL-6) *Interleukin-6*

(KH) *Homology to hnRNP K*

(MAPK) *Mitogen Activated Protein kinase*

(MBNL1) *Muscleblind-like splicing regulator 1*

(Met-tRNAi) *Aminoacetylated initiator methionyl-t Ribonucleic Acid*

(MM) *Myélome multiple/Multiple Myeloma*

(mRNA) *messenger Ribonucleic Acid*

(mRNP) *messenger ribonucleoprotein particle*

(NAC) *N'acetylcystéine*

(NES) *Nuclear Export Sequence*

(NF) *Nuclear Factor*

(NLS) *Nuclear Localization Sequence*

(NTD) *N-Terminal domain*

(PABP) *Poly (A)-Binding Protein*

(PAR-CLIP) *Photoactivatable-Ribonucleoside Enhanced CLIP*

(PARN) *Poly(A) specific ribonuclease*

(PB) *P body*

(PBS) *Phosphate Buffered-Saline*

(PCNA) *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

(PCR) *Polymerase Chain Reaction*

(PERK) *Protein Kinase Receptor-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

(PI) *Propidium Iodide*

(PKR) *Protein Kinase RNA-activated*

(PP) domaine d'interaction entre protéines

(qRT-PCR) *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*

(RACK1) *Receptor for Activated C Kinase 1*

(RB) Rétinoblastome/*Retinoblastoma*

(RBP) Protéine de liaison à l'ARN/*RNA Binding Protein*

(RGG) Région riche en Glycine-Arginine/*Arginine Glycine Rich region*

(RIP) Immuno précipitation de l'ARN/*RNA immunoprecipitation*

(RNA) *Ribonucleic Acid*

(RNP) Complexes ribonucléoprotéiques/*Ribonucleoprotein complexes*

(RP) Particule régulatrice/*Regulatory Particle*

(RRM) Motifs de reconnaissance à l'ARN/*RNA Recognition Motif*

(RSK2) *Ribosomal S6 Kinase*

(RT) Transcription réverse/*Reverse Transcription*

(S2) Cellule de Schneider/*Schneider cell*

(SDS) *Sodium Dodecyl Sulfate*

(SDS-PAGE) *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

(SERBP1) *Serpine 1 RNA Binding Protein*

(SG) *Stress Granule*

(ShRNA) *Small hairpin RNA*

(SiRNA) *Small Interfering RNA*

(SMN) *Survival of Motor Neuron*

(SRP) *Signal Recognition Particle*

(TDP43) *TAR DNA-binding Protein 43*

(TIA-1) *T-cell Internal Antigen 1*

(TOP) *Terminal Oligopyrimidine*

(TRAF2) *TNF-Receptor Associated Factor 2*

(UPP) *Voie Ubiquitine-Protéasome/Ubiquitin Proteasome Pathway*

(UTR) *Untranslated region*

(UVC) *UltraViolet C*

(VEGF) *Vascular Endothelial Growth Factor*

Remerciements

Je voudrais d'abord et avant tout remercier le Dr Mazroui pour m'avoir accepté en 2008 dans son laboratoire pour un stage en recherche. J'aimerais également le remercier du support qu'il m'a apporté au cours de toutes ces années de maîtrise et de doctorat. Le Dr Mazroui est un excellent professeur qui de par sa passion pour la science, sait éveiller l'intérêt pour la recherche. Je suis très heureuse et honorée d'avoir fait partie de votre laboratoire, j'ai beaucoup appris, merci Dr Mazroui.

Bien sûr à cela, je remercie énormément tout le personnel du laboratoire que j'ai connu tout au long de ces années de stage, maîtrise et doctorat. Un grand merci à Mme Marie-Josée Fournier, Mme Christine Filion, Mr. David Martel, Mme Laetitia Coudert et au Dr Y. Labelle.

J'aimerais ensuite remercier mon père et ma mère, de leur énorme support envers mes études. Merci pour tout, merci tellement de m'encourager dans tout ce que je fais. Vous êtes les meilleurs parents et je vous aime beaucoup.

Merci à mon frère Maximilien et mes sœurs Valérie et Sophie d'avoir toujours été là pour moi.

Finalement, merci à tous mes amis qui m'ont tellement supporté dans tous mes choix, périples et aventures! Un gros merci à la patrouille de ski de « Revelstoke Mountain Resort » et surtout à Kevin Thomas pour m'avoir encouragé dans tous mes projets et surtout dans celui-ci, qui était de finir le doctorat.

Avant-Propos

Au cours de ma formation au doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, j'ai eu l'occasion de développer deux thèmes de recherche, qui ont été initiés lors de ma maîtrise.

Lors de ma maîtrise, j'ai d'abord étudié la localisation de la protéine « Drosophila Fragile X Mental retardation » (dFMRP) dans les conditions de stress, et son rôle dans la formation des granules à ARN, chez la drosophile. Brièvement, j'ai (i) révélé un nouveau mécanisme par lequel la protéine « Fragile X Mental retardation » (FMRP) induit la formation d'un nouveau type de granules à ARN qui sont des granules de stress (GS) non classiques (ii) fournit une évidence pour laquelle l'activité de « shuttling » de FMRP entre les granules à ARN et le cytosol est régulée, ouvrant ainsi de nouvelles avenues de recherche pour caractériser les voies de signalisation qui régulent le dynamisme de FMRP et ces ARNms cibles entre les granules à ARN et le cytoplasme, et (iii) participé à la réalisation d'un système clonal de la drosophile permettant l'étude du rôle des voies de signalisation dans la formation des GS *in vivo*. Ces travaux ont conduit à la production de deux articles (Annexe 2.1-2.2: Gareau *et al.* Plos One and Biology Open 2013), pour lesquels je suis première auteure puisque j'ai (i) initié le domaine de la drosophile au laboratoire (ii) réalisé la plupart des résultats *in vitro*, inclus dans ces travaux, et (iii) participé à leur rédaction. Bien que j'ai finalisé ces études pendant mon doctorat, je les considère comme des travaux de maîtrise et donc ils ne seront pas discutés dans cette thèse. Néanmoins, ces études m'ont permis d'acquérir une formation solide dans le domaine des GS pour ainsi développer mes propres projets de doctorat.

Dans mon premier projet de doctorat, j'ai enquêté sur la contribution possible de la formation des GS dans la chimiorésistance. De ceci, j'ai trouvé que le traitement des cellules cancéreuses avec l'agent chimiothérapeutique Bortézomib (Bz), induit les GS. Ce travail pionnier montre donc que la formation des GS peut se produire suite aux traitements thérapeutiques. La formation des Bz-GS se produit à travers un mécanisme qui implique l'activation de la kinase HRI. La suppression des Bz-GS, via la déplétion de HRI, sensibilise les cellules cancéreuses au Bz. Dans ce travail publié dans Cancer Cell international en 2010, je suis co-première auteure puisque j'ai participé à la rédaction et à la réalisation des résultats à parts égales avec Mme Marie-Josée Fournier (voir Résultats 3.1). Suite à ces résultats, nous avons concentré nos efforts à tenter de répondre à notre question principale concernant la contribution possible de la formation des GS dans la chimiorésistance. De ces études, j'ai trouvé une implication pour les GS dans l'expression du facteur anti-apoptotique p21, via la protéine de liaison à l'ARN CUGBP1, promouvant ainsi la chimiorésistance des cellules cancéreuses face au Bz. Cette étude a été publiée en 2011 chez *PLoS ONE* et constitue la base d'un de mes projets principaux de thèse de doctorat (voir Résultats 3.2). Pour cet article, j'ai également participé à la rédaction du manuscrit, j'ai réalisé la plupart des résultats et contribué à l'analyse des résultats.

En plus de ces travaux principaux, j'ai collaboré à la réalisation d'autres contributions scientifiques. Notamment, j'ai eu l'opportunité de faire un stage dans le laboratoire du Dr Strub à l'Université de Genève en Suisse. Lors de ce stage, j'ai apporté l'expertise des GS au laboratoire du Dr Strub dont la thématique de recherche porte sur les ARNs *Alu* et leurs protéines de liaison, les SRPs. Cette collaboration mena à la publication d'un article tout récemment publié dans le journal *Nucleic Acids Research*, pour lequel je suis coauteure puisque j'ai réalisé une partie des résultats portant sur les GS. Dans cet article, nous décrivons que l'hétérodimère SRP9/14 se retrouve dans les GS suite à un traitement d'arsénite ou d'hippuristanol. La déplétion de SRP9/14 diminue le nombre de GS ainsi que leurs tailles. La localisation de SRP9/14 dans les GS semble dépendre de sa liaison à la sous-unité 40S; cependant cette liaison est dépendante des ARNs *Alu* puisque ceux-ci seraient en compétition avec la sous-unité 40S pour se lier à SRP9/14. De cette étude ressort un modèle dans lequel la liaison de SRP9/14 avec la 40S, favorise la formation des GS alors que l'augmentation des ARNs *Alu*, suite à un stress, promeut le désassemblage des GS via la dissociation de SRP9/14 avec la sous-unité 40S (Annexe 2.3).

J'ai également contribué à la réalisation d'un autre travail de notre laboratoire portant sur l'étude du rôle des facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF4G1, dans la formation des GS induite par des stress modérés. Ce travail, publié dans MCB en 2013, montre que la formation des complexes eIF4E-eIF4G1, qui est dépendante de la voie mTOR, est requise pour l'assemblage des GS. Pour cet article, j'ai produit les résultats qui démontrent que le PP242 ou la déplétion de p21 sensibilise des tumeurs xénogreffes *in ovo* et alors diminue de manière significative la croissance tumorale (Annexe 2.4).

Finalement, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec le laboratoire du Dr Khandjian, sur un projet portant sur la formation de granules induites par les radiations UVC (GUVVC). Dans cette étude, nous décrivons que les GUVVC sont différentes des PBs. Les GUVVC contiennent des ARNs et certains marqueurs des GS, ce qui fait qu'elles partagent certaines similarités avec les GS. De manière intéressante, la formation des GUVVC, contrairement à celle des GS, se produit sans une diminution drastique de l'initiation de la traduction. Les GUVVC représenteraient donc un type de GS unique. Lorsque les cellules sont traitées aux UVC, celles-ci arrêtent leurs cycles cellulaires en G1 et entrent dans un stade de quiescence qui leur permet de réparer leur ADN endommagé. Une corrélation entre le désassemblage des GS et l'entrée des cellules en phase S fut observée. De cela, nous proposons que les GUVVC contribuent à l'arrêt du cycle cellulaire suite au traitement UVC en séquestrant, sous forme réprimée, un ensemble spécifique d'ARNs codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. J'ai collaboré à cette étude en réalisant les expériences de *in situ* hybridization (FISH) à l'aide des Oligos dT. Ces expériences permirent de localiser les ARNs dans les GUVVC (Annexe 2.5).

1. Introduction générale sur la réponse au stress et son implication dans le Cancer

1.1. Généralités

Le génome humain contient environ 25 000 gènes, soit environ le même nombre que celui de votre plante ou bien même deux fois le nombre que contient la mouche à fruits. Je me souviens encore m'être posé la même question que plusieurs personnes ont eue très longtemps avant moi, comment se fait-il qu'avec si peu de gènes nous pouvons être qui nous sommes, des organismes vivants, complexes et développés. Je comprends maintenant que la réponse à cette question se trouve dans l'*expression génique* et sa régulation.

L'expression génique est un processus général qui dans l'ensemble, lit et utilise de manière sélective, l'information génétique. En d'autres mots, l'expression génique est un processus fondamental, responsable du phénotype. L'expression génique regroupe une série de procédés commençant avec l'initiation de la transcription suivie de la synthèse de transcrits primaires d'ARN messagers (ARNms) dans le noyau de la cellule (Figure 1.1). Ces ARNms primaires sont ensuite soumis à de multiples procédés de maturation tels que : à l'addition de la coiffe en 5', la polyadénylation en 3', l'épissage constitutif et alternatif, et dans certains cas à une édition de l'ARN. Ces mécanismes de maturation de l'ARNm permettent à l'ARNm primaire de devenir mature et actif. Les ARNms fonctionnels sont ensuite exportés hors du noyau au cytoplasme, où ils sont traduits en protéines. Une régulation stricte de ces procédés reliés à l'ARN est cruciale au bon développement d'un individu et une erreur dans ces procédés pourrait engendrer des malformations et des maladies.

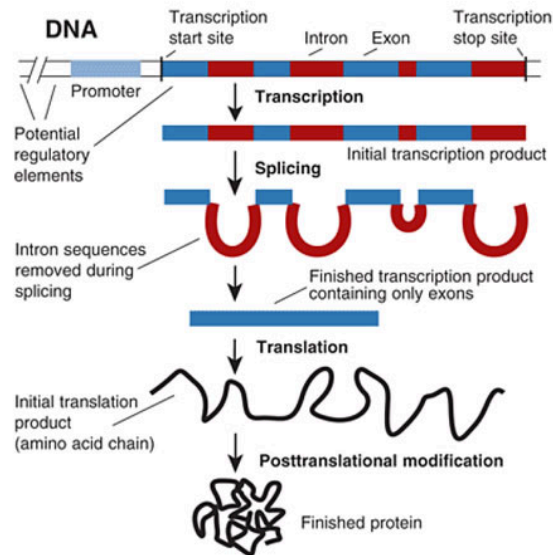


Figure 1-1 Les processus de l'expression génique.

L'expression génique regroupe une série de procédés qui commencent au niveau de l'ADN. L'ADN est d'abord soumis à l'initiation de la transcription et à la transcription d'ARNms primaires. Ce pré-ARNm naissant est ensuite supprimé de ses introns au cours d'un processus appelé l'épissage. Les exons restants sont réunis pour former un ARNm mature et prêt pour la traduction. Cet ARNm mature est ensuite exporté dans le cytoplasme où il peut être traduit en une protéine. Enfin, cette protéine subit plusieurs modifications post-traductionnelles pour devenir une protéine complète et fonctionnelle. Cette figure a été extraite du site web : <http://www.news-medical.net/health/what-is-gene-expression.aspx>. et a été consultée le 9 mai 2015.

Récemment, la localisation des ARNms dans la cellule fut révélée comme étant un facteur très important au cœur de divers mécanismes cellulaires. En effet, un nouveau domaine de recherche a été développé pour tenter de lier les mécanismes post-transcriptionnels avec la localisation cytoplasmique de certains ARNms matures. Ce nouveau domaine de recherche implique la formation de granules à ARN [1]. En effet, les granules à ARN agissent comme des modulateurs clés dans le contrôle des mécanismes post-transcriptionnels [1].

Les granules à ARN sont des collections spécifiques et ordonnées de protéines de liaison à l'ARN, d'ARNms, de facteurs de traduction, et de molécules de signalisation, qui se regroupent et forment de petits agglomérats visibles au microscope. Ces granules à ARN jouent un rôle clé dans la régulation post-transcriptionnelle, soit par l'intermédiaire de leur capacité de stockage ou bien de par leur dynamique. L'altération des mécanismes post-transcriptionnels via les granules à ARN, fait maintenant partie des sujets en vogue sur la cause ou la conséquence de diverses maladies. Comme nous allons voir plus loin, il existe quatre types majeurs de granules à ARN. La formation d'un de ces types de granules à ARN, la granule de stress (GS), est maintenant reconnue comme un mécanisme intrinsèque de réponse cellulaire au stress. Dans cette thèse, je discuterai comment les GS, par l'entremise de leurs protéines de liaison à l'ARN, peuvent influencer le

contrôle des mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans le développement de certaines maladies humaines liées au stress.

1.2. Les protéines de liaison à l'ARN

Les protéines de liaison à l'ARN comptent environ 800 membres [2,3], qui pour la plupart d'entre elles possèdent des domaines conservés de liaison à l'ARN. Trois de ces domaines conservés incluent : le domaine riche en glycine-arginine (RGG), le domaine de motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM) et les domaines d'homologies hnRNPk (KH). Ces domaines permettent à leurs protéines d'interagir avec des ARNms et d'autres ARNs non codants, pour ainsi produire des complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) fonctionnels. Les complexes RNPs, par l'intermédiaire de leurs protéines de liaison à l'ARN dictent le devenir des ARNms [3]. De par leurs localisations, les protéines de liaison à l'ARN ont deux grandes sphères d'activités, soit des activités liées au noyau ou bien au cytoplasme. À l'intérieur du noyau cellulaire, les protéines de liaison à l'ARN régulent la maturation des ARNms, l'épissage des ARNms, les activités liées à l'hélicase ARN, et également l'export nucléaire [3]. Dans le cytoplasme, les protéines de liaison à l'ARN régulent le transport d'ARNms, la répression d'ARNms, la traduction des ARNms et leurs demie-vies [3]. En plus de toutes ces activités liées aux ARNs, les protéines de liaison à l'ARN sont impliquées dans de multiples interactions protéiques, étant importantes pour la régulation de l'activité des complexes RNPs et autres agrégats spécifiques. L'agrégation des protéines de liaison à l'ARN est médiée par des domaines de basse complexité, incluant les domaines hydrophobiques RG [4] et les domaines de types prions [4]. Cette agrégation des protéines de liaison à l'ARN fut impliquée dans la formation des granules à ARN, autant dans des études *in cellulo* [5,6] que dans des études *in vitro* [6,7]. Ces observations ont alors rendu les protéines de liaison à l'ARN, des facteurs importants dans la formation des granules à ARN.

1.3. Les granules à ARN

Les types majeurs de granules mRNPs incluent les GS [8,9,10], les «P-bodies» (PBs) [8,10,11], les granules germinales [10,12] et les granules neuronales (GNs) [10,13]. Ces différents types de granules à ARN ont toutes certaines similitudes et différences entre elles, soit dans leurs rôles, leurs compositions, ou bien dans leurs dynamiques. Elles sont également impliquées dans plusieurs volets de la biogenèse de l'ARN, tels que dans la surveillance, le transport, la localisation subcellulaire, la traduction et la demie-vie des ARNms [3]. De plus, cette capacité, que possèdent certains types de granules à ARN, à réguler le métabolisme des ARNms,

s'est révélée importante pour la survie cellulaire. Ainsi, des défauts dans la biologie de la granule à ARN peuvent mener au développement de certaines pathologies humaines liées au stress, incluant la neurodégénération [6]. Toutefois, les rôles physiologiques et pathologiques des granules à ARN, restent encore mal connus. Un de mes projets de recherche a pour but d'identifier et repérer des évidences supportant le rôle des granules à ARN de type GS, dans le développement de pathologies humaines.

Pour ceci, je vais alors introduire les quatre grands types de granules à ARN : les granules de surexpression, les GNs, les PBs, et les GS. Ces quatre types de granules à ARN, ont tous en communs certaines composantes, indiquant des rôles similaires entre eux.

Les granules de surexpression, comme leurs noms l'indiquent, sont induites suite à une surexpression de différentes protéines de liaison à l'ARN telles que G3BP[14], TIA[15] et FMRP[5]. La composition des granules de surexpression est dépendante de la dose de la protéine surexprimée. Sur ce, des études ont démontré que la surexpression de G3BP induit des granules dépendamment de la dose de G3BP donnée [16]. De plus, dans cette même étude, Reineke *et al.* ont découvert que la répression de la traduction est présente que dans les granules-G3BP étant de larges tailles [16]. En effet, les auteurs ont démontré par des expériences de ribopuromycilation que la traduction était fortement réprimée dans les granules-G3BP larges, mais serait plutôt présente et active dans les petites granules-G3BP. De façon intéressante, cette étude évoque que la taille, des granules à ARN telles que les granules de surexpression, serait en quelque sorte reliée à la traduction de par le changement du contenu de ces granules tout au long de leur existence, i.e. la granule à ARN évoluerait au cours du temps. Le rôle de ces granules à ARN induites par la surexpression des protéines de liaison à l'ARN reste toutefois, une énigme. Une partie de mes travaux de maîtrise a consisté à étudier le rôle des granules de surexpression de FMRP, appelées granules FMRP (Annexe 2.1-2.2).

Les GNs, spécifiques aux neurones, ont été reportées à agir comme transporteurs d'ARNms réprimés, du soma vers les synapses situées en partie distales de la cellule neuronale (Figure 1.2). Suite aux stimulations synaptiques, les ARNms stockés dans les GNs sont relâchés pour être traduits localement et rapidement en protéines spécifiques assurant une plasticité synaptique optimale. La plasticité synaptique chez les cellules neuronales est nécessaire au bon fonctionnement neuronal, qui regroupe les fonctions d'apprentissage, de mémoire, et de coordination [17,18,19].

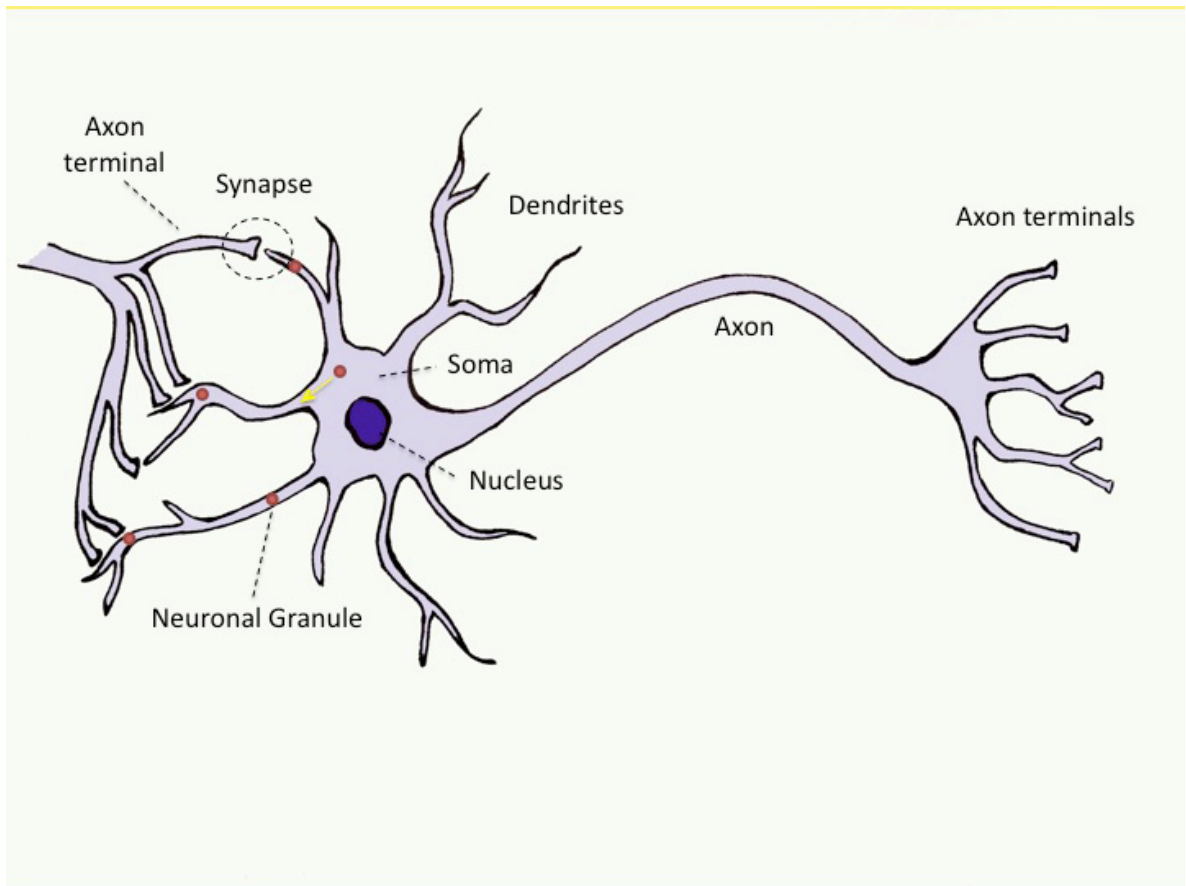


Figure 1-2. Structure du neurone classique, et localisation des granules neuronales

Le neurone typique peut être divisé en trois parties: le soma, les dendrites et l'axone avec ses parties terminales. Le soma est le corps cellulaire du neurone, celui-ci est compact et possède généralement plusieurs types d'organelles fonctionnelles. Du soma, peuvent émerger plusieurs dendrites qui sont des structures filamenteuses qui permettent l'échange avec d'autres neurones via les connexions synaptiques. Du soma ressort également un axone qui peut se prolonger sur une grande distance. Les granules neuronales sont un type spécifique de granules à ARN que l'on retrouve dans les dendrites des neurones. Les granules neuronales sont caractérisées comme des transporteurs puisque celles-ci bougent du soma aux jonctions synaptiques des dendrites. Ces granules sont soupçonnées de déplacer des ARNms réprimés aux jonctions synaptiques, où la traduction de ces ARNms est requise.

À l'encontre des GNs, qui sont neurones spécifiques, les PBs ont été reportés, dans la majorité des types cellulaires testés, comme étant des foyers cytoplasmiques regroupant des RNPms réprimés de la traduction. Les PBs sont présents de manière constitutive dans la cellule et se retrouvent alors dans la cellule en conditions normales ou de stress. Les PBs semblent également agir comme des sites de dégradation pour certains ARNms. En régulant la traduction et la dégradation d'ARNms, les PBs participent donc au maintien d'un équilibre efficace de l'expression génique en conditions de croissance normale des cellules.

À la différence des PBs et des GNs, les GS ne sont détectées que dans les cellules subissant un stress. Les GS représentent le sujet principal de tous mes projets de recherches. Dans les cellules stressées, les GS apparaissent adjacentes aux PBs. Cette disposition permet une communication et un échange de protéines

entre ces 2 types de granules. Il est proposé que ce trafic intergranules, permet de trier les ARNm pour soit les dégrader dans les PBs ou les protéger dans les GS en condition de stress. Les stress causant l'assemblage des GS sont nombreux et incluent : les chocs thermiques chauds[20] ou froids[21], les stress oxydatifs induits par l'arsénite [5,22,23], l'hypoxie [24], les infections virales [25,26], et les radiations UV [27,28]. Les GS depuis leurs découvertes chez les cellules de plantes en 1983 [29] et chez les mammifères en 1998 [30,31] ont été le sujet de nombreuses études menant à plusieurs avenues de recherches, comme celle du cancer et de ses traitements, ici parlé dans cette thèse.

1.3.1. Les granules de stress

1.3.1.1. La formation des granules de stress

Pour survivre au stress, les cellules doivent rapidement activer des mécanismes de survie cellulaire. Un de ces mécanismes implique l'inhibition de l'initiation de la traduction générale pour prioriser la traduction de protéines de survie cellulaire. Dans la plupart des conditions de stress, l'inhibition de l'initiation de la traduction est accompagnée par la formation des GS. Ceci stipule un lien fonctionnel entre la formation des GS et l'inhibition de l'initiation de la traduction.

La première étape de l'initiation à la traduction consiste en la formation d'un complexe ternaire entre la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction (eIF2), le GTP, et le Met-tRNA_i et de son attachement à la petite sous-unité ribosomale 40S, le tout formant le complexe de préinitiation de la traduction [32] (Figure 1.3). Ce complexe de préinitiation est ensuite joint à l'ARNm. Ce procédé implique l'activation du facteur eIF3 et du complexe eIF4F, comprenant les facteurs eIF4E, 4G, et 4A [32] (Figure 1.3). Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, est responsable pour la reconnaissance de la plupart des ARNm cellulaires. Celui-ci reconnaît les ARNm en interagissant avec leur structure (m⁷GpppN) située dans leurs extrémités 5' [33,34]. Cette dernière interaction est également renforcée par le facteur eIF4G [35,36]. Lors de l'initiation à la traduction, eIF4G, par l'entremise de son interaction simultanée avec eIF3 et eIF4E, sert de protéine d'échafaudage permettant le lien entre la sous-unité ribosomale 40S et l'ARNm (Figure 1.3) [32,34,37,38]. Ceci mène alors à la formation d'un complexe stable d'initiation à la traduction de 43S, qui balaie l'ARNm pour le codon d'initiation. Une fois positionné sur le codon d'initiation, il y a formation du complexe 48S, qui relâche les facteurs eIF4F et eIF2 α pour accepter la sous-unité ribosomale 60S. Cette nouvelle addition permet alors la formation du complexe 80S, prêt pour la traduction.

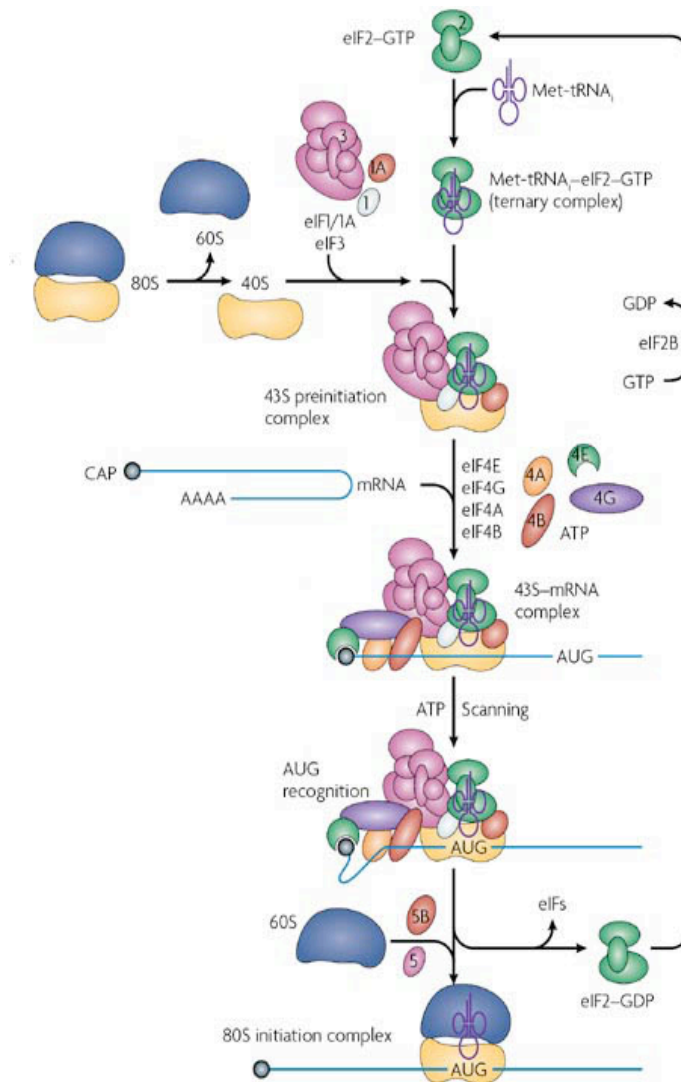


Figure 1-3 L'initiation de la traduction.

Pour que l'initiation à la traduction commence, les sous-unités ribosomales 40S ainsi que des sous-unités multiples d'initiation, doivent se lier à la fois au Met-tRNA_i et à l'ARNm. Dans l'ensemble, une fois que la Met-tRNA_i se lie à la sous-unité ribosomale 40S, formant un complexe eIF2-GTP avec les facteurs eIF1 et eIF1A, le complexe de préinitiation 43S peut ensuite être formé. Cette formation du complexe 43S est renforcée par la présence de la protéine de liaison cap, eIF4E, qui est associée à eIF4G. Cette interaction entre eIF4G et eIF3 stabilise le complexe de préinitiation 43S, ce qui lui permet de scanner l'ARNm pour le codon d'initiation AUG. Une fois que le codon de départ est trouvé et se lie à l'anticodon Met-tRNA_i, la protéine d'activation de GTPase eIF5, aide eIF2 à hydrolyser la GTP. Ensuite, le complexe eIF2-GDP se dissocie du complexe ribosomale 40S et est recyclé par eIF2B, qui est un facteur d'échange guanine nucléotidique. L'échange du facteur GDP pour le facteur GTP par eIF2B, requiert la phosphorylation de eIF2 par au moins une des quatre kinases (HRI, GCN2, PERK, PKR). Enfin, la formation du complexe d'initiation 80S a lieu après l'assemblage de la sous-unité ribosomale 60S promu par la GTPase eIF5B. Cette figure a été tirée de Fraser C.S. and Doudna J.A., Nature reviews Microbiology (2007).

Depuis longtemps, les GS étaient seulement connues pour être induites via un mécanisme exigeant la phosphorylation de la sérine 51 sur eIF2 α [9], qui est également un mécanisme majeur conduisant à l'inhibition de l'initiation de la traduction. La phosphorylation de eIF2 α , provoquée par le stress, est produite via l'activation de quatre kinases. PERK (« Protein kinase receptor-like Endoplasmic Reticulum Kinase ») est majoritairement activée par des stress touchant au réticulum endoplasmique; PKR (« Protein Kinase RNA-activated ») est une kinase qui est principalement activée par des infections virales; GCN2 (« General Control Non derepressible 2 ») est activée lors d'une privation d'acides aminés ou d'une inhibition du protéasome chez les fibroblastes embryonnaires de souris; et finalement HRI (« Heme-regulated inhibitor kinase ») est activée lors de stress thermiques, osmotiques, et oxydatifs. La phosphorylation d'eIF2 α , induite suite à l'activation de PERK, PKR, GCN2 ou HRI, diminue le niveau d'initiation à la traduction en prévenant la formation de complexes ternaires fonctionnels eIF2-GTP-Met-tRNAi. Cette diminution de complexes ternaires aboutit à la formation et à l'accumulation de complexes d'initiation à la traduction, non fonctionnels et réprimés qui sont suspectés d'être les principaux constituants pour l'initiation de la formation des GS [39]. Toutefois, il demeure incertain de comment ces complexes d'initiation à la traduction deviennent réprimés et s'accumulent pour engendrer la formation des GS. Néanmoins, ce modèle de formation des GS relance la possibilité que l'inactivation d'autres facteurs eIFs puisse induire la formation des GS.

Plus récemment notre laboratoire et d'autres, ont identifiés par un dépistage génétique et pharmacologique, des facteurs spécifiques d'initiation de la traduction (incluant eIF4A, eIF4B, et eIF4H) pouvant induire la formation des GS suite à leurs inhibitions. Cette formation des GS est indépendante de la phosphorylation d'eIF2 α [40,41]. Conceptuellement, cette formation de GS suggère l'implication de l'accumulation de complexes d'initiation à la traduction, déficients ou réprimés. Notre laboratoire a récemment montré que l'inactivation de eIF4E ou de son partenaire eIF4G1, supprime la formation des GS sous certaines conditions de stress, supportant ainsi l'implication des complexes d'initiation de la traduction sur la formation des GS (Annexe 2.4).

Puisque les GS sont connues pour inhiber l'initiation de la traduction, il a été suggéré que ces entités représentent des sites où la traduction, de certains ARNms spécifiques, est réprimée [42]. Les GS pourraient réprimer la traduction de ces ARNms en inhibant, en partie, les interactions entre les ARNms et les polyribosomes actifs. Le rôle potentiel des GS dans la répression de la traduction est supporté par l'observation que des ARNms spécifiques sont inefficacement réprimés lorsque des protéines de liaison à l'ARN, contribuant à la formation des GS, sont réprimées [15,27,43,44,45]. Plusieurs études, dont celle présentée ici dans cette thèse, démontrent que certains ARNms sont des composants des GS. De plus, les GS semblent également contenir des protéines de liaison à l'ARN possédant un rôle important dans la stabilité

de l'ARNm. Nous démontrons dans cette étude que certains ARNms peuvent être séquestrés à l'intérieur des GS, où ceux-ci peuvent être stabilisés.

1.3.1.2. Composition et caractéristiques des granules de stress

Composition

La liste des composantes des GS ne cesse de s'allonger au fur et à mesure que le domaine de la recherche avance (Annexe 1). Toutefois, il est connu jusqu'à maintenant que les GS contiennent des facteurs d'initiation à la traduction tels que eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, et eIF3 [42], des protéines de liaison à l'ARN (TIA-1, FMRP, FXR1, CUGBP1, PABP, G3BP)[5,14,42,46,47], des molécules de signalements (TRAF2, RACK1, RSK2, G3BP1...)[48,49,50,51], et des ARNms (p21 mRNAs, FMRP mRNAs, TOP mRNAs, C-myc mRNAs...)[16,44,47,52] (Annexe 1). Cependant, la présence de la petite sous-unité ribosomale 40S dans les GS, est controversée et peut dépendre du type de stress et du type de cellule utilisé [25,53]. En revanche, il est accepté que ni la sous-unité ribosomale 60S et ni les facteurs d'élongation de la traduction sont des composants des GS. Le fait que la sous-unité 60S est exclue des GS, supporte à nouveau l'hypothèse selon laquelle les ARNms associés aux GS sont traductionnellement réprimés. Comme déjà mentionné, les GS serviraient donc de sites spécifiques où les ARNms peuvent être stockés sous une forme non traduite.

Dynamique

Des études faites au microscope électronique démontrent que les GS sont des structures démunies de membranes [54]. Cette absence de membrane autour des GS suggère une certaine dynamique de leurs composantes entre l'intérieur et l'extérieur de la granule. Des études biochimiques ont démontré que les protéines de liaison à l'ARN, présentes dans les GS, sont insolubles aux détergents et donc résistantes aux protéinases [6]. Cette caractéristique des GS serait en partie conférée par les microtubules [42,55]. Le réseau des microtubules est également soupçonné d'agir comme guide pour le trafic des composantes de GS [56]. Des expériences de photo blanchiment (FRAP), ont montré que des composantes spécifiques des GS telles que CUGBP1 [57], TIA [23,58,59], FMRP [60], et G3BP1 [58] sont continuellement en mouvement avec l'extérieur de la granule, validant ainsi le dynamisme des GS [42,58]. Les ARNms sont également dynamiques et se déplacent continuellement entre le cytoplasme et la GS. À l'aide d'ARNms rapporteurs, des études chez les muscles d'embryons de drosophiles ont démontré la dynamique des ARNms entre les GS et le cytoplasme [61]. Toutefois, les mécanismes qui contrôlent la cinétique du trafic des protéines et des ARNms

au sein des GS restent encore méconnus. En outre, une autre propriété dynamique des GS est celle du fait que ces entités sont réversibles. Lorsque le stress, responsable de la formation des GS diminue ou se prolonge, les GS se désassemblent et relâchent alors leur contenu dans le cytoplasme de la cellule. Cette capacité des GS à se désassembler après le stress confie à ceux-ci un rôle majeur qui est le potentiel de ces granules à protéger leurs composantes du stress. En effet, une fois que le contenu des GS est relâché, celui-ci peut retourner à ses activités d'origine. Par exemple, une des activités clés à être reprise après le stress est la traduction des ARNms. Cependant, les mécanismes gouvernant le désassemblage des GS restent largement méconnus. En somme, les mécanismes d'assemblage et de désassemblage contribuent au contrôle de la traduction, lors du stress. Cette caractéristique des GS à être réversibles est l'un des nouveaux concepts impliqués dans la survie cellulaire contre le stress.

Importance pathologique

La formation des GS est au centre de la réponse au stress grâce à sa capacité d'influencer la survie cellulaire via son habileté à contrôler l'expression génique [9]. Par exemple, il a été démontré que la formation aigüe des GS via une exposition à l'hypoxie [49] ou à un stress oxydatif [62] pourrait conduire des cellules tumorales à résister contre des mécanismes d'apoptose. Toutefois, la formation prolongée des GS semble être létale pour les cellules et notamment pour les cellules neuronales. Depuis, les GS furent impliquées dans le développement d'une variété de maladies, allant des maladies neurodégénératives jusqu'au cancer. Plusieurs maladies neurodégénératives sont reconnues comme étant des protéinopathies. En effet, les maladies neurodégénératives sont souvent liées à une agrégation de protéines spécifiques, comme dans le cas des inclusions Tau chez la maladie de l'Alzheimer [63]. Il a été suggéré que les GS promeuvent ces maladies neurodégénératives en agissant comme des sites de nucléation pour des inclusions pathologiques [63]. Par exemple, les inclusions Tau, associées à la maladie de l'Alzheimer, démontrent une colocalisation avec le marqueur de GS, TIA-1 (« T-cell internal antigen-1 »).

Dans le cas du cancer, les GS sont connues pour promouvoir la résistance des cellules cancéreuses contre le stress. Ceci se produit essentiellement par l'entremise de deux mécanismes. Le premier mécanisme implique la séquestration de molécules de signalisation de mort cellulaire, telles que Rack1[64], Traf2[48], et Raptor[65], à l'intérieur des GS, inhibant ainsi les voies apoptotiques correspondantes et engendrées par des stress tels que l'arsénite, le choc thermique et l'hypoxie. Le second mécanisme implique la surexpression de facteurs de croissance et de protéines anti-apoptotiques, via la formation des GS. Par exemple, l'équipe de Moeller *et al.* a démontré le rôle des GS dans la résistance des cellules tumorales via la surexpression du facteur VEGF en réponse aux radiations gamma. Le mécanisme par lequel les GS induisent la surexpression

de VEGF implique la stabilisation de son ARNm dans les GS [66]. Dans des études pionnières, j'ai démontré que les GS peuvent également se former suite à un traitement chimio thérapeutique, notamment en traitant les cellules cancéreuses avec des inhibiteurs du protéasome [67]. Depuis, ce phénomène a également été constaté avec l'utilisation d'autres agents chimio thérapeutiques [68,69]. Cette formation des GS, dans les cellules cancéreuses est pertinente, car elle promeut leur chimiorésistance [67]. La possibilité de cibler les voies de formation des GS pourrait alors devenir une nouvelle et prometteuse approche de traitement contre le cancer.

1.4. Le cancer et la chimiorésistance

1.4.1. Le cancer

L'origine du mot cancer appartient au physicien Grecque Hippocrate (460-370 B.C.). Hippocrate a utilisé les termes *carcinos* et *carcinoma*, signifiant « crabe » en grecque, pour décrire une maladie ayant l'apparence d'un crabe, due à ses projections se propageant dans le corps. Plus tard, un physicien romain au nom de Celus traduit le terme grec en latin donnant lieu au nom, actuellement connu: *Cancer*.

Comme le démontre l'origine du mot, le cancer n'est pas une maladie récente. Toutefois, cette maladie est maintenant connue comme une des principales causes de décès. Comme rapporté par la *Société Canadienne du Cancer*, environ 2 sur 5 Canadiens développeront un cancer dans leurs vies et 1 sur 4 de ceux-ci en mourront.

Donc, qu'est-ce que le cancer? En quelques mots, le cancer est le résultat d'une division cellulaire incontrôlée. Les cellules normales deviennent cancéreuses lorsque la progression de leurs cycles cellulaires est compromise. Afin de garantir la bonne progression du cycle cellulaire, celui-ci est soigneusement surveillé et contrôlé par une série de points de contrôles, situés à différents emplacements stratégiques. Ces points de contrôles préviennent la cellule de procéder à la prochaine étape de la division cellulaire, en cas de défauts dans le processus. Cependant, lorsqu'un de ces points de contrôles ne parvient pas à ses responsabilités, la cellule peut se diviser et proliférer de manière anarchique, résultant possiblement en une formation de tumeurs. La tumorigénèse implique alors des produits de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, dans le contrôle des mécanismes régissant l'apoptose et dans la réparation des dommages à l'ADN. Ces gènes peuvent être classés en deux catégories générales: les proto-oncogènes (promouvant la

croissance) et les suppresseurs de tumeurs (inhibition de la croissance). Encore une fois, lorsque ces gènes ne parviennent pas à protéger la progression normale du cycle cellulaire, une prolifération et une croissance incontrôlée peuvent survenir, qui sont à l'origine du cancer.

1.4.1.1. L'implication des gènes dans le cancer

Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs sont deux classes de gènes de par lesquels leurs protéines aident à protéger la cellule contre une prolifération et une croissance anarchique qui pourrait engendrer la formation d'une tumeur.

La fonction principale des gènes suppresseurs de tumeurs est d'inhiber la prolifération anormale de la cellule en arrêtant le cycle cellulaire lorsque nécessaire. Toutefois, des mutations peuvent s'insérer dans ces gènes et alors interrompre la fonction inhibitrice de ces gènes. Ce type de mutation est appelé mutation de perte de fonction. Toutefois, pour que le gène suppresseur de tumeur soit totalement inactivé, il est nécessaire que les deux copies de ce gène soient mutées, puisque ce type de mutation est récessive. La mutation de *perte de fonction* sur un gène suppresseur de tumeurs empêche celui-ci d'arrêter le cycle cellulaire pour arrêter la prolifération et donc empêcher un éventuel cancer.

D'autre part, les proto-oncogènes sont des gènes cellulaires normaux, impliqués dans les procédés de croissance cellulaire chez les cellules normales. Ces gènes sont connus pour être impliqués dans l'embryogenèse, en raison de leurs produits étant impliqués dans la division et la différenciation cellulaire. Toutefois, lorsque ces proto-oncogènes obtiennent des mutations de *gain de fonction*, ceux-ci peuvent devenir des *oncogènes*. Les produits protéiques des oncogènes ont l'habileté de pouvoir transformer des cellules en culture ou bien de promouvoir le cancer chez les mammifères. Il existe trois mécanismes différents pouvant convertir les proto-oncogènes en oncogènes. Le premier mécanisme s'agit de la *mutation ponctuelle*. Une mutation ponctuelle est une mutation qui affecte un seul nucléotide et engendre un changement d'identité de l'acide aminé dans lequel se trouve le nucléotide muté. Le second mécanisme est l'amplification génique, dans lequel le procédé de la réplication de l'ADN est compromis et donc plus d'une copie du gène est produite. Finalement, le troisième mécanisme est la translocation chromosomique qui transporte le segment d'un gène à un différent endroit dans le génome et donc sous le contrôle d'un promoteur différent. En somme, ces trois mécanismes ont la capacité d'engendrer une expression génique inappropriée du gène cible. Contrairement à la mutation de perte de fonction, ces trois mécanismes de gain de fonction agissent de manière dominante, puisque seulement une copie du gène doit être affectée pour que celle-ci mène à un possible cancer.

Ces mutations, peu importe leurs origines ou le type de cancer d'où elles proviennent, influencent un ensemble spécifique de fonctions vitales à la cellule, pour engendrer la tumorigénèse. En l'an 2000, le Dr Hanahan et son équipe ont délimité des traits communs spécifiques, partagés entre les cellules cancéreuses. Ces traits communs entre les cellules cancéreuses ont été reconnus comme les *caractéristiques du cancer* (« Hallmarks of Cancer »).

1.4.1.2. Les caractéristiques du cancer

Le cancer est un des plus grands défis de notre ère en termes de complexité. Au cours des années, plusieurs chercheurs dans leurs dévotions à comprendre le cancer et à tenter de simplifier sa complexité ont découvert un certain motif commun entre les cellules cancéreuses. En l'an 2000, le Dr Hanahan et son collègue Dr, R.A. Weinberg ont suggéré que le vaste répertoire des génotypes de cancer était une manifestation de six altérations essentielles au sein de la physiologie de la cellule [70]. Cette nouvelle théorie a déclaré qu'un petit nombre acquis de traits moléculaires, cellulaires, et biochimiques était partagé entre la plupart et peut-être tous les types de cancers humains [70]. De ces pensées ont émergé les six caractéristiques du cancer (Figure 1.4). L'autosuffisance dans le signal de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'évasion à la mort cellulaire programmée, le potentiel réplicatif infini, l'angiogenèse soutenue, et l'invasion des tissus comprenant la métastase définissent les six caractéristiques du cancer déclaré par Hanahan et Weinberg. Onze ans plus tard, en 2011, Hanahan et son collègue ajoutèrent 2 traits additionnels aux caractéristiques du cancer, qui sont : le potentiel à reprogrammer le métabolisme énergétique et le potentiel à évader la destruction par le système immunitaire [71].

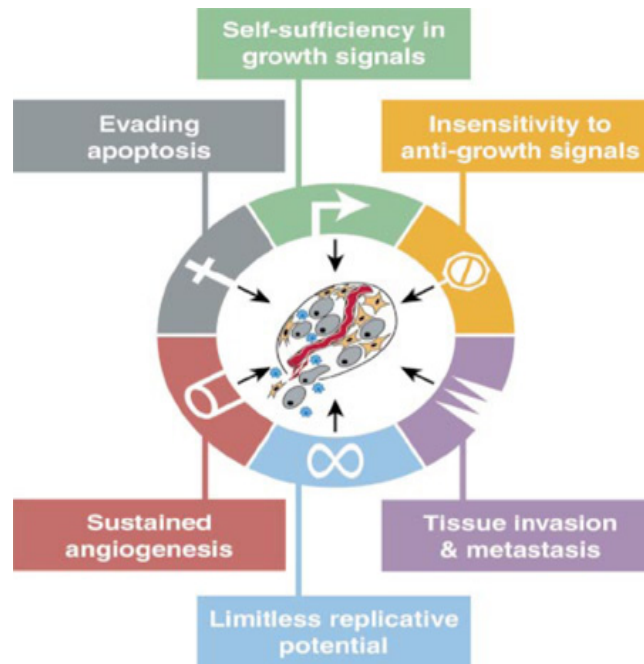


Figure 1-4 Les Caractéristiques du Cancer.

En l'an 2000, le Dr D. Hanahan et son collègue le Dr R. A. Weinberg ont suggéré que la vaste gamme des traits cancéreux était le résultat de six modifications cruciales au sein de la physiologie de la cellule. Ces six critères sont les suivants: la capacité des cellules à éviter l'apoptose; l'autosuffisance de la part des cellules dans les signaux de croissance; l'insensibilité des cellules aux signaux d'anti-croissance; la capacité des cellules à envahir les tissus et créer des métastases; le potentiel répliatif illimité des cellules; et la capacité des cellules à soutenir l'angiogénèse. Cette figure a été extraite de Hanahan D., Weinberg R. A., Cell (2000); 100; 57-70.

1.4.1.3. Les types de cancers et leurs classifications

Même si des traits communs entre les cellules cancéreuses ont été découverts, il demeure important, en clinique et en recherche, de comprendre comment les différents cancers sont classifiés de par leurs niveaux et de par leurs types. En effet, afin de développer de nouvelles stratégies contre le cancer, il est important de comprendre le protocole de classement des cancers. Le cancer est classifié de deux façons : soit par l'organe d'origine, où le cancer s'est développé, ou bien de par le type cellulaire dans lequel la tumeur s'est développée. Le premier type de classification est le type le plus connu et il consiste à nommer le cancer de par le nom de l'organe d'origine dans lequel celui-ci a débuté. Le second type de classification implique le type cellulaire dans lequel le cancer a commencé. Le corps humain est constitué de divers types de cellules, qui tous ensemble forment les tissus et les organes principaux du corps humain. Chez les mammifères, il existe quatre types de tissus : le tissu épithélial, le tissu conjonctif, le tissu musculaire et le tissu nerveux. Ces tissus sont des matrices organisées de différents types cellulaires, travaillant tous ensemble afin d'accomplir

une fonction spécifique. Le rôle exact d'un certain tissu dépend alors des différents types de cellules qui le composent. Un des facteurs intéressants à propos de cette diversité cellulaire, formant un tissu, est que tous ces types de cellules ont des programmes transcriptionnels différents. Cela signifie que, pour maintenir le bien-être d'un tissu, par exemple contre le cancer, un réglage fin entre les différents taux de réplication et de croissance de chaque cellule doit exister. Le tissu épithélial est principalement constitué d'une diversité de cellules épithéliales qui recouvrent les surfaces intérieures et extérieures des cavités du corps. Les cancers qui prennent naissance dans les cellules épithéliales sont nommés, *carcinomes*. Selon l'institut de Support du Cancer MacMillan, ces cancers représentent de 80 à 90 % des cancers diagnostiqués.

Les cancers qui commencent dans les cellules du tissu conjonctif sont classés dans la famille des *sarcomes*. Il existe deux principaux types de sarcomes: les sarcomes osseux et les sarcomes des tissus mous.

Les cancers qui commencent dans les cellules sanguines sont appelés *leucémies* et proche de ce type de cancer est le cancer du *myélome* qui est un autre type de cancer commençant dans les globules blancs, plus spécifiquement les plasmocytes. Le plus courant des cancers hématologiques est actuellement le *myélome multiple* (MM), qui sera également discuté dans mes études. Dans ce type de cancer, la prolifération des cellules du myélome dans la moelle osseuse provoque une diminution de la formation des globules et provoque également une résorption osseuse locale. D'autre part, les cancers qui commencent dans le système lymphatique sont appelés *lymphomes*. La figure 1.5 résume ces derniers types de cancers des plus courants. Il existe d'autres types de cellules qui sont connus pour devenir cancéreux tels que des cellules du cerveau, mais ces types de cancers sont moins fréquents.

TNM peuvent ensuite être attribuées à un stade spécifique du cancer. Il existe cinq stades au cancer, et les critères de chacun de ces stades varient selon le type de cancer. Le stade 0 décrit un cancer *in situ* tandis que les phases I à IV correspondent à la croissance du cancer, à sa dissémination et à l'invasion de celui-ci vers les ganglions lymphatiques et les tissus éloignés.

1.4.1.5. Le traitement du cancer et ses avancements

Durant les deux dernières décennies, la recherche sur le traitement du cancer a considérablement évolué, passant de la chirurgie simple et de l'utilisation d'agents cytotoxiques non spécifiques à une diversité de nouveaux traitements biologiques et moléculaires. Par exemple, certains de ces nouveaux traitements comprennent la thérapie hormonale, l'hyperthermie, la thérapie au laser, des inhibiteurs de l'angiogenèse, l'immunothérapie et les thérapies dites « ciblées ». L'un des principaux domaines de recherche fondamentale sur le cancer est basé sur la découverte de voies moléculaires favorisant la croissance tumorale et la maintenance de celle-ci. Les thérapies « ciblées » bloquent alors, essentiellement ces voies moléculaires, ou des oncoprotéines, qui favorisent la croissance des cellules tumorales et leurs survies [72].

Malgré toutes ces nouvelles avancées, la plupart de ces traitements ne sont qu'au stade de recherche, et un traitement anti-cancer efficace et sans récurrence reste encore inconnu. La chimiothérapie avec l'utilisation d'agents cytotoxiques non spécifiques, qui cible les cellules se divisant rapidement, est encore la voie principale utilisée en traitement contre le cancer. En effet, cette caractéristique des cellules cancéreuses à se développer et à renouveler leurs protéines rapidement nécessite de la part de ces cellules une régulation rapide et efficace des mécanismes cellulaires tels que la disposition des déchets cellulaires pouvant être toxique à la cellule si ceux-ci sont accumulés. Ce dernier fait constitue le concept clé utilisé dans les traitements actuels contre le cancer. En effet la dégradation rapide des protéines spécifiques ou inutiles, est vitale pour la cellule cancéreuse. L'une des principales voies responsables de la dégradation des protéines intracellulaires est la voie de dégradation dépendante des ubiquitines (« Ubiquitin-Proteasome Pathway »(UPP)) [73]. Par ce fait, le ciblage du protéasome fait partie de l'un des nombreux domaines prometteurs pour le traitement du cancer.

1.4.2. Le protéasome et son implication dans le cancer

1.4.2.1. Le protéasome

Les protéasomes sont des composants essentiels de la voie protéolytique dépendante de l'ATP, et sont responsables de la dégradation de la plupart des protéines cellulaires [73,74]. Le protéasome 20S possède de multiples activités peptidases qui fonctionnent par l'entremise du système protéolytique impliquant la thréonine kinase [74]. Les protéasomes 26S/30S servent à dégrader les protéines ubiquitinilées et sont composés d'une particule catalytique 20S (CP) et soit d'une ou deux particules régulatrices 19S (RP) (Figure 1.7) [75]. Le protéasome 26S est donc composé de la 20S CP en forme de tonneau et d'une RP 19S située à une des extrémités de la 20S. En ce qui concerne le protéasome 30S, il est composé de la CP 20S où celle-ci est coiffée de deux RP 19S situées à chaque extrémité de la 20S. La CP est composée de 28 sous-unités organisées en quatre anneaux, empilés, formant la chambre centrale où se produit la protéolyse (Figure 1.6) [73]. Parmi ces sous-unités, six d'entre-elles sont situées sur les bagues intérieures et portent des résidus catalytiques pour les sites protéolytiques, qui sont: deux de type chymotrypsine ($\beta 5$), deux de type trypsine ($\beta 2$), et deux de type caspase ($\beta 1$) [76]. L'activité de type chymotrypsine situé sur la sous-unité $\beta 5$ est associée à l'étape limitante de la protéolyse [77]. Les bagues extérieures de la 20S CP sont faites de sept sous-unités alpha différentes, qui ont pour objectif principal d'être structurelles (Figure 1.6).

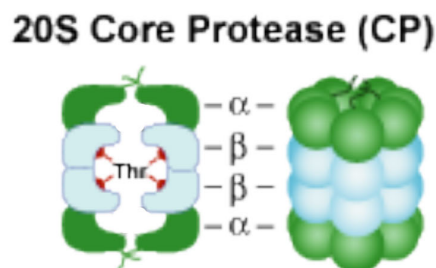


Figure 1-6 Schéma de la particule catalytique (20S) du protéasome.

Le complexe 20S est formé de 28 sous-unités organisées en 4 anneaux empilés, formant la chambre centrale où se produit la protéolyse. Sur les bagues intérieures se trouvent 6 sous-unités catalytiques comportant : deux de type chymotrypsine ($\beta 5$), deux de type trypsine ($\beta 2$), et deux de type caspase ($\beta 1$). Sur les bagues extérieures se trouvent les sous-unités structurelles, alpha. Cette figure a été extraite du site web : [http://www.uscnk.com/directory/26S-Proteasome\(26S-PSM\)-0650.htm](http://www.uscnk.com/directory/26S-Proteasome(26S-PSM)-0650.htm) et a été consultée le 18 mai 2015.

La protéine polyubiquitinilée est d'abord reconnue par la particule régulatrice 19S, qui ensuite clive la chaîne d'ubiquitines de cette protéine pour permettre à celle-ci de se dérouler et d'accéder à la CP (Figure 1.7). La nomenclature pour les différentes particules des protéasomes a été basée sur le coefficient de sédimentation (valeur S) qui est déterminé par une méthode impliquant la centrifugation de sucrose en gradients de densités [74,75].

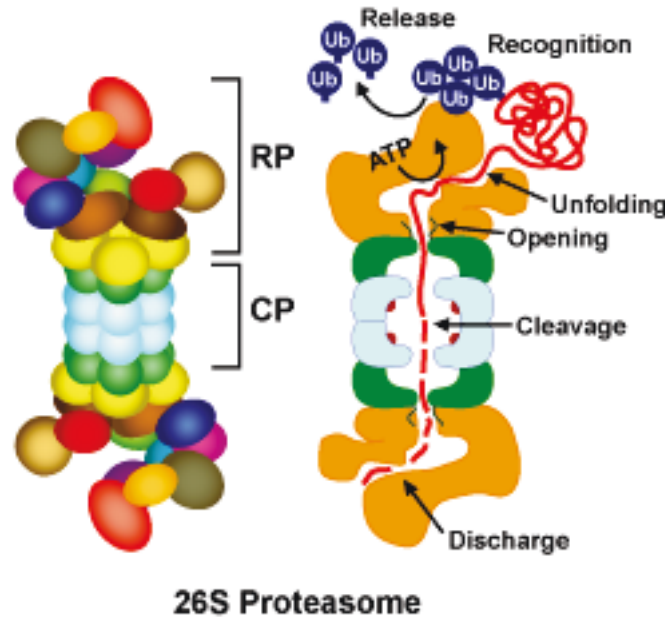


Figure 1-7 Le Protéasome 26S.

Le protéasome 26S est un composant essentiel de la voie de dégradation protéolytique, dépendante de l'ATP. Le complexe 26S, responsable de dégrader les protéines ubiquitinilées, contient une particule catalytique 20S (CP) et une particule régulatrice 19S (RP). Le complexe 19S sert à reconnaître les protéines ubiquitinilées et à les acheminer dans la chambre centrale 20S pour qu'elles soient dégradées. Cette figure à été extraite du site web : [http://www.uscnk.com/directory/26S-Proteasome\(26S-PSM\)-0650.htm](http://www.uscnk.com/directory/26S-Proteasome(26S-PSM)-0650.htm) et a été consultée le 18 mai 2015.

1.4.2.2. La voie ubiquitine-protéasome

La protéolyse des protéines cellulaires est un mécanisme complexe et très important qui est hautement régulé par de nombreux substrats et enzymes. La voie ubiquitine-protéasome (UPP) est une de ces voies de dégradation protéique, qui est très spécifique envers ses substrats cibles. Parmi les substrats cibles de l'UPP se retrouvent des composants du cycle cellulaire, qui sont des facteurs régulateurs de croissance, des enzymes de voies métaboliques de signalisation, et des protéines mutées ou endommagées lors des mécanismes de post-traduction [78]. La protéolyse par l'UPP comporte deux étapes distinctes, mais

successives (Figure 1.8). La première étape implique la fixation covalente de multiples molécules d'ubiquitines sur le substrat cible. Tandis que la seconde étape implique la dégradation de la protéine polyubiquitinilée cible, par le protéasome.

La première étape qui consiste à la liaison des molécules d'ubiquitines à la protéine cible se fait, elle, en trois actions. La première action de cette liaison implique l'activation de la Glycine en C-terminal de l'ubiquitine par une enzyme ubiquitine-activatrice E1 [78]. Après l'activation, les enzymes E2 transfèrent les ubiquitines activées par E1 à l'ubiquitine-ligase E3, à laquelle la protéine cible est liée [78]. Ce dernier procédé peut être répété et donc générer une chaîne de polyubiquitines qui est fixée au substrat. L'enzyme E3 est responsable de la liaison covalente entre la chaîne polyubiquitine et le substrat. La chaîne polyubiquitine agit comme un drapeau, i.e. sa fonction est d'être reconnue en tant que cible par le protéasome, pour permettre à la protéine marquée d'être dégradée. Une fois que le substrat est marqué par la chaîne de polyubiquitines, celui-ci est reconnu via ses polyubiquitines par le récepteur de l'ubiquitine situé sur la RP 19S. À ce stade, le substrat peut entrer dans le noyau du protéasome, où il sera dégradé. Une fois que le substrat est dégradé, les ubiquitines sont recyclées par les isopeptidases [78] (Figure 1.8).

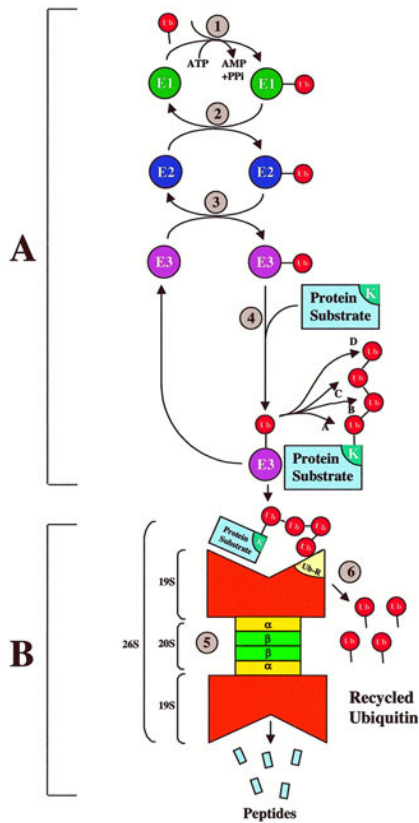


Figure 1-8 La voie Ubiquitine-Protéasome (UPP).

La protéolyse par le système UPP comporte deux étapes distinctes, mais successives. La première étape (A) comprend la conjugaison de l'ubiquitine à la molécule cible et la seconde étape (B) comprend l'étiquetage et la dégradation du substrat ciblé par le protéasome 26S. (1) Activation de l'ubiquitine par E1. (2) Transfert de l'ubiquitine activée de E1 à un membre de la famille E2. (3) Transfert à nouveau de l'ubiquitine activée de E2 à un substrat spécifique-E3. (4) Formation d'un complexe substrat-E3 et biosynthèse d'une chaîne polyubiquitines fixée au substrat. (5) Liaison de la chaîne polyubiquitines au récepteur d'ubiquitine sur le complexe 19S du protéasome 26S. La chaîne polyubiquitines est ensuite dégradée par le complexe 20S en de courts peptides. (6) Recyclage des ubiquitines par l'action des isopeptidases. Cette figure a été extraite de Ciechanover A., *Embo J.* (1998); 17, 7151-7160.

L'UPP peut être modifié de différentes manières, par exemple, il peut dégrader les mauvaises protéines, peut trop dégrader, ou tout simplement ne pas dégrader et donc conduire à un niveau cytotoxique de protéines non nécessaires ou endommagées dans la cellule. Le blocage du protéasome peut donc influencer la croissance des cellules et plus particulièrement influencer les cellules qui ont une rotation rapide des protéines, telles que les cellules cancéreuses. Pour cette raison, les inhibiteurs du protéasome ont été mis en valeur dans la recherche sur le cancer depuis maintenant plus de dix ans.

1.4.2.3. Les inhibiteurs de protéasome

Alors que les inhibiteurs du protéasome ont été créés au cours d'études sur l'atrophie musculaire [79], leur intention première était d'être des agents anti-inflammatoires [76]. De cela, les premiers inhibiteurs de protéasome à être développés, ont été de simples peptides aldéhydes [79,80] mimant le substrat préféré du site actif du protéasome [79]. Le MG132, un carbobenzyl-Leu-Leu-Leu-aldehyde, était l'un de ces premiers inhibiteurs du protéasome. Malgré les progrès de la recherche qu'a apportés le MG132, ce dernier n'a pas été approuvé par la FDA en raison de ses effets secondaires et de son manque de spécificité. Cependant peu longtemps après l'apparition du MG132, un nouvel inhibiteur de protéasome est produit, remplaçant l'aldéhyde par un boronate. Ce composé a été nommé le Bortézomib (Bz) (Velcade®/PS-341)[79]. En 1999, des études avec le Bz ont montré que ce médicament avait un motif de cytotoxicité unique, contre un éventail multiple de cellules cancéreuses provenant de différents cancers [81]. En outre, le Bz peut réduire le taux de croissance des tumeurs xénogreffes chez la souris [82] et peut également réduire le taux de métastases [83]. Ces études aidèrent le Bz à entrer dans les essais cliniques plus rapidement et en 2002, ces essais cliniques de phase I ont montré des réponses positives avec les patients souffrant de myélomes multiples (MM) [84]. Positivement, ces dernières observations invitèrent le Bz dans des essais cliniques de phase II mais de façon plus importante, elles précipitèrent son approbation par la FDA [79,85]. En 2003, le Bz était le premier inhibiteur de protéasome à être approuvé par la FDA. Le Bz est un dipeptide-acide boronique qui inhibe de manière réversible l'activité catalytique de la chymotrypsine sur la bague β_5 au cœur du protéasome 20S (Figure 1.6). En bloquant la protéolyse, le Bz perturbe de nombreuses voies de signalisation cellulaire qui en fin de compte mènent à l'arrêt du cycle cellulaire. Pendant des années, on a cru que la cible principale du Bz était le facteur nucléaire (NF) kappa β [86], qui était bloqué par la dégradation protéosomique de l'inhibiteur $\kappa B\alpha$ ($I\kappa B\alpha$). Cependant, en 2002, des études bloquant le facteur NF κB , directement avec un inhibiteur de NF κB (PS-1145), ont montré que, bien que ce facteur contribue à l'activité du Bz chez les MM, il n'est pas le principal facteur responsable de ces résultats antinéoplasiques [87]. L'une des principales préoccupations concernant l'utilisation des inhibiteurs de protéasome en clinique était leurs toxicités potentielles et leurs capacités à pouvoir bloquer le fonctionnement cellulaire normal. Toutefois, la présence d'autres enzymes dans la cellule pouvant désassembler les protéines ubiquitinées, signifie que seulement une fraction de ces protéines ubiquitinées serait accumulée [79]. Par conséquent, en fonction de la dose et de la période de traitement, les cellules peuvent encore bien fonctionner pour une certaine durée. Aux doses thérapeutiques, le Bz n'a pas d'incidence significative sur les cellules normales. En retour, le Bz affecte de manière significative les cellules de myélome, qui sont sensibles à cette fraction de l'inhibition en raison de leurs taux élevés de protéines anormales et de renouvellement protéique. Le Bz fut initialement présenté comme un traitement de troisième ligne pour les patients ayant des MM réfractaires. Toutefois, en 2008, il passa à un traitement de première

ligne pour les patients nouvellement diagnostiqué avec des MM [79]. En outre, selon l'Institut national du cancer, le Bz est désormais également utilisé sur des patients souffrant de lymphomes et qui ont déjà reçu un traitement initial, négatif.

En clinique, le Bz est administré par voie intraveineuse ou sous-cutanée sous forme de cycles. Un cycle de traitement comprend habituellement des injections, deux fois par semaine, sur une durée de deux semaines, suivi d'un intervalle de dix jours. Au cours des dernières années, plusieurs autres inhibiteurs du protéasome sont entrés dans les essais cliniques (Oprozomib®, Ixazomib citrate®, Marizomib® et Delanzomib®) et même un de ces inhibiteurs, le Carfilzomib® (Kyprolis, PR-171) a été approuvé en 2012, par la FDA.

Malgré ces résultats positifs, le Bz semble avoir des effets réfractaires lorsqu'il est utilisé sur des tumeurs solides [76,88].

Jusqu'à maintenant il existe très peu d'explications sur les mécanismes de résistance intrinsèque au Bortézomib. Toutefois, quelques études ont exploré les mécanismes de résistance, qui sont acquis lors du, ou après le traitement au Bz. Un de ces mécanismes de résistance acquis suite à l'exposition au Bz, comprend les mutations ponctuelles sur la sous-unité $\beta 5$ de la particule catalytique 20S du protéasome (voir 1.4.2.1 *Le Protéasome*). Comme déjà mentionné, la sous-unité $\beta 5$ est critique à la protéolyse et le Bz se lie à cette sous-unité pour en inhiber son activité. Une mutation ponctuelle dans la sous-unité $\beta 5$ empêche alors le Bz de s'y lier et d'en empêcher son activité catalytique. Plusieurs mutations ont été montrées à promouvoir une résistance chez les cellules cancéreuses traitées au Bz. À l'aide de cellules lymphoblastiques, résistantes au Bz, créé à partir de cellules Jurkat soumises à répétition à des traitements Bz, les auteurs Lü S. et Wang J. ont découvert des mutants de la sous-unité $\beta 5$ comprenant séparément les mutations G322 A, C323 T et la mutation conjointe G322 A/C326 T. Selon leurs résultats le gène codant pour la sous-unité $\beta 5$, comprenant la mutation ponctuelle G322 A, confère à la cellule la plus forte résistance au Bz, en comparaison aux autres mutations. La structure cristalline de la sous-unité $\beta 5$ chez la levure démontre des interactions spécifiques entre la chaîne pyrazine-2-carboxyl du Bortézomib et les résidus de la poche S1 de la sous-unité $\beta 5$ (Figure 1.9) [77].

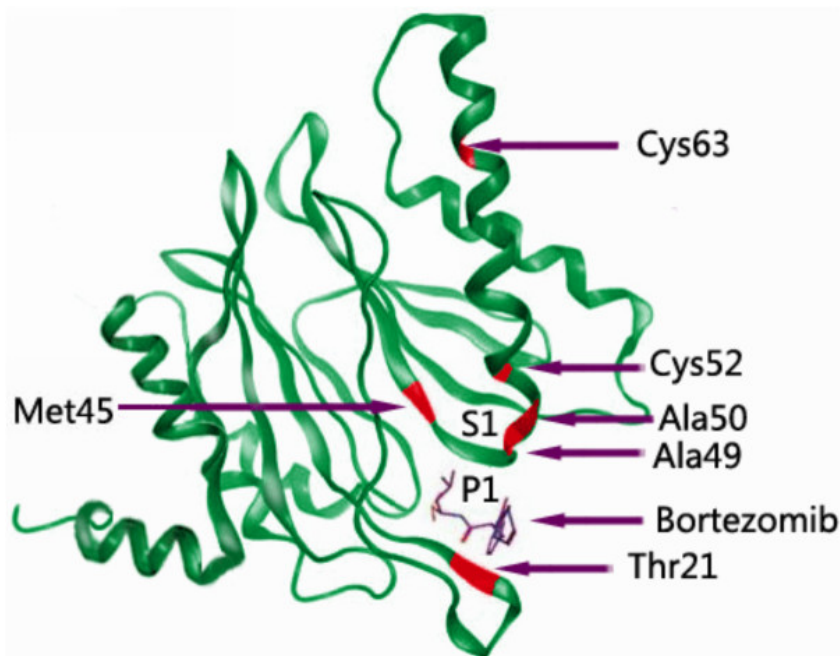


Figure 1-9 Structure cristalline de la sous-unité β5 accompagnée de ses sites de mutations inhibant la liaison au Bortézomib.

Modèle 3D du squelette de la protéine β5 (sous-unité de type chymotrypsine situé dans la particule catalytique 20S du protéasome), basé sur la structure cristalline du protéasome chez la levure [89] et chez le bovin [90]. Ce modèle a également été basé sur les études de Franke et al. [91], de Wilt et al. [92], et Suzuki et al. [93]. Les différentes mutations inhibant l'interaction entre le Bortézomib et la β5 sont représentées en rouge. P1 représente la chaîne pyrazine-2-carboxyl du Bortézomib « substrate side chain 1 » et S1 représente la poche spécifique de la sous-unité β5 « specificity binding Pocket 1 ». La mutation G322 A correspond à une substitution de Ala49Thr. Cette figure a été tirée de l'article « The résistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib » fait par Shuqing Lü et Jianmin Wang, publié dans *Biomark Research* en 2013.

Des analyses de modélisation par ordinateur suggèrent que la mutation G322 A entraîne un changement de conformation de la sous-unité β5 et donc inhibe l'interaction entre le Bz et le site catalytique de type chymotrypsine β5. Plusieurs autres auteurs ont confirmé la résistance que confère la mutation G322 A, et ceci dans d'autres types cellulaires tels que des cellules de macrophages monocytaires humains [94], des cellules de MM [91,95], et des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë [91]. L'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de croissance de type insuline « insulin-like growth factor » (IGF-1) peuvent également maintenir la croissance cellulaire et conférer à la cellule une résistance au Bz, en activant le facteur NF-κB à travers les voies Raf/MEKK1 et PI3-K/Akt. Des études faites par Zhang et al. montrent que le facteur IL-6 joue un rôle crucial dans l'occurrence de la résistance au Bz chez des échantillons de moelle osseuse provenant de patients souffrant de MM [96]. Le facteur IGF-1 est connu pour être surexprimé chez les myélomes et ce niveau élevé d'IGF-1 a été lié à la progression, la sévérité, et au pronostic de certaines maladies, dont le cancer. L'équipe de Kuhn et al. révèlent qu'une augmentation de IGF-1 est associée à un phénotype de résistance au Bz chez

des cellules de myélomes, et ce, sans la présence de mutations sur la sous-unité $\beta 5$ [97]. De plus, cette dernière étude démontre également par profil d'expression génique que les gènes fortement activés par IGF-1 étaient chroniquement exprimés chez les lignées cellulaires résistantes au Bz [77,97]. Toutes ces dernières études illustrent des mécanismes de résistance qui sont acquis face au Bz. Pour revenir aux mécanismes de résistance au Bz, intrinsèques à la cellule, de Wilt et al. démontrent qu'un niveau de base élevé d'activité du protéasome corrèle avec la résistance cellulaire intrinsèque au Bz, et ceci dans différentes lignées de cellules cancéreuses de poumon (« non-small cell lung cancer ») [92]. Les traitements thérapeutiques peuvent potentiellement générer un stress cellulaire, contribuant à la résistance au traitement. Nous suggérons que la formation des GS pourrait constituer un nouveau mécanisme de résistance cellulaire intrinsèque à l'inhibiteur de protéasome Bz. La figure 1.10 résume les différents mécanismes connus de résistance acquise ou intrinsèque à la cellule cancéreuse.

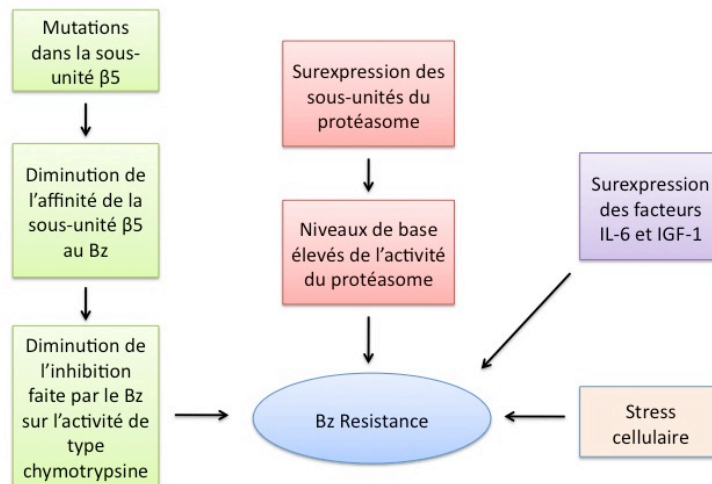


Figure 1-10 Résumé des mécanismes de résistance au Bortézomib.

Les mutations acquises par le Bortézomib et présentes sur la sous-unité $\beta 5$ (voir Figure 1.9) peuvent entraîner un changement de conformation de la $\beta 5$ et donc diminuer l'interaction entre celle-ci et le Bortézomib, ce qui résulte en une diminution de l'inhibition de l'activité de type chymotrypsine. La présence de hauts taux d'activité protéosomique corrèle avec la résistance des cellules au Bortézomib et correspond à un mécanisme de résistance intrinsèque à la cellule. La surexpression des facteurs IL-6 et IGF-1 corrèle avec la résistance au Bortézomib et serait un mécanisme de résistance acquise au Bortézomib. Nous proposons que la formation des GS est un nouveau mécanisme de résistance cellulaire intrinsèque, au Bortézomib. Cette figure a été inspirée et adaptée de la figure 4 de l'article « The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib » fait par Shuqing Lü et Jianmin Wang, publié dans *Biomark Research* en 2013.

Comme il a été démontré que l'inhibiteur de protéasome MG132 peut induire la formation de GS, il était intéressant de vérifier si la formation de GS était également présente suite au traitement avec le Bz. Puisque la formation de GS a été impliquée dans la survie cellulaire, l'idée est venue de vérifier si cette chimio-résistance causée par le Bz pourrait être attribuée partiellement à la formation de GS. Comme démontré dans la section résultats, je démontre que le Bz induit effectivement la formation de GS et ceci par l'entremise de la phosphorylation de eIF2 α , activée par la kinase régulée par l'hème (HRI).

1.5. La kinase « Heme-Regulated inhibitor » (HRI)

HRI a été découvert chez les réticulocytes, où son activation cause la désagrégation des polysomes, inhibant ainsi la synthèse des globines [98,99]. L'activation de HRI se produit suite à son hyper-autophosphorylation en conditions de déficience en hème. La première autophosphorylation effectuée par la HRI nouvellement synthétisée, se produit suite à la liaison initiale entre l'hème et HRI dans le premier domaine de liaison à l'hème, situé dans la partie N-terminale de HRI (Figure 1.11 (a)). Cette première autophosphorylation stabilise HRI et l'empêche de se regrouper avec d'autres HRI [100]. Lorsque les concentrations de l'hème sont normales ou élevées, l'hème peut se lier au second domaine de liaison à l'hème, situé dans la partie centrale de la protéine HRI (Figure 1.11 (b)) entre les sites catalytiques, et alors inactiver HRI. Ce dimère de HRI, stable et inactif, permet alors la synthèse des globines. Cependant, dans des conditions de carence en hème, HRI atteint la dernière étape d'autophosphorylation, à la thréonine 485, et devient alors activé [100,101]. HRI possède de nombreux sites différents d'autophosphorylation, dont deux sont cruciaux : T485 et K196 (Figure 1.12) [102].

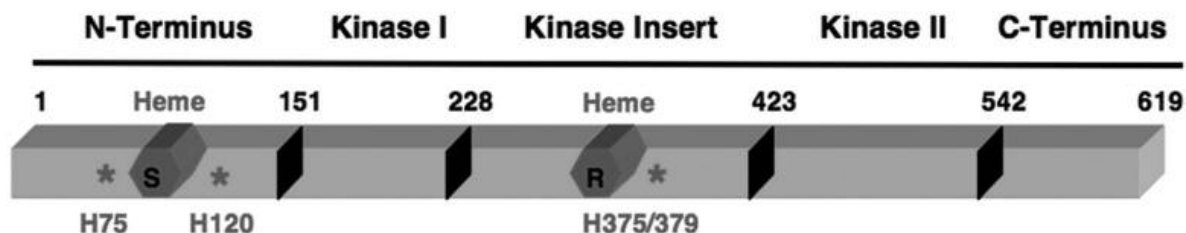


Figure 1-11 Les domaines de liaison à l'hème de la protéine HRI.

La séquence d'acides aminés utilisée dans cette figure représente la séquence de HRI chez la souris. HRI comporte 5 domaines, dont deux domaines de liaison à l'hème. (a) Le « S » dans la figure dénote le premier domaine de liaison stable à l'hème. (b) Le « R » dénote le second domaine de liaison à l'hème qui est réversible. Cette figure a été tirée de l'article « Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anémias », Chen J.J., *Blood*, (2007).



Figure 1-12 Domaines et sites de phosphorylation de la kinase HRI.

La kinase HRI est composée d'un domaine N-terminal (NTD) (acides aminés 1–144) (représenté en rouge) et d'un domaine Kinase situé en C-terminal (acides aminés 145–619) (représenté en vert) incluant une autre région de kinases (« kinase insert ») (acides aminés 244–371) (représenté en jaune). Les peptides qui déterminent les sites de phosphorylation qui ont été identifiés par les auteurs Igarashi *et al.* à l'aide d'une digestion par la trypsine et d'un type de purification spécifique. Finalement les sites de phosphorylation marqués en gras sont des sites qui ont été identifiés dans des études antérieures à celle de Igarashi *et al.* Cette figure a été extraite de l'article « Autophosphorylation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2a kinase and the role of the modification in catalysis », Igarashi *et al.*, (2011).

Une fois activé dans les érythrocytes, HRI peut phosphoryler eIF2 α et bloquer la synthèse des globines. Le développement de souris HRI^{-/-} permet de nombreuses avancées dans la recherche. Par exemple, les études portant sur ces souris apportèrent des preuves *in vivo* soutenant la théorie selon laquelle HRI régule la synthèse de l'hémoglobine [100]. L'absence de HRI fut également impliquée dans une maladie liée à la synthèse de l'hémoglobine. En effet, lorsque HRI est absent et le niveau de l'hème est insuffisant, la traduction des globines α et β continue, provoquant à la fin, une accumulation de ces molécules dans les érythrocytes [103,104]. Cette accumulation conduit alors à la précipitation de ces globines sous forme d'agrégats toxiques [103,104]. Et enfin, ces agrégats toxiques provoquent la lyse des érythrocytes, causant l'anémie [100]. Pendant longtemps, HRI semblait être uniquement affilié aux cellules sanguines, toutefois nous savons maintenant que les ARNms HRI peuvent être trouvés dans un large éventail de cellules non érythroïdes [105,106], notamment dans les cellules cancéreuses issues d'origine solide. Récemment, nous

avons proposé, ainsi que d'autres, un nouveau rôle pour HRI dans le domaine du cancer et de la chimiorésistance [67]. De notre part, nous avons découvert que l'activation de HRI est essentielle pour la formation des GS en réponse à l'agent chimio thérapeutique Bz, causant ainsi la survie cellulaire [67]. Ces derniers résultats menèrent alors à un autre projet qui me permit d'identifier que les GS induites par le Bz régulent une voie anti-apoptotique, par l'entremise du stockage de l'ARNm p21 [107].

1.6. L'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21^{WAF1/CIP1}

L'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines 1A (CDKN1A), également connu sous le nom de p21^{WAF1/CIP1}, appartient à la famille Cip et Kip, des inhibiteurs de CDK, qui sont surexprimés en conditions de stress [108]. Sous forme nucléaire, p21 est principalement reconnu pour ses implications dans l'arrêt du cycle cellulaire, en réponse à une variété de stress. Comme facteur antiprolifératif, p21 fut décrit comme ayant un potentiel anti tumoral [109,110,111,112]. Cependant, l'activité de p21 dans le cancer semble posséder un double rôle puisque d'autres groupes ont décrit p21 comme un facteur qui protège les cellules tumorales contre l'apoptose [113,114,115,116]. Cette activité anti apoptotique de p21, associée à sa localisation cytoplasmique, lui confère alors un rôle pro cancer pouvant expliquer sa forte expression dans les cancers chimiorésistants tels que le cancer du sein [117], le cancer de l'estomac [118] et le cancer des testicules [119].

En conditions normales de croissance, l'expression de l'ARNm p21 est très faible, ce qui pourrait être expliqué par la courte demi-vie de son ARNm, qui est d'environ 60 minutes [108]. Dans des conditions de stress, l'expression de p21 est fortement augmentée. En plus de son induction transcriptionnelle en réponse au stress, la demi-vie de l'ARNm p21 augmente également de façon significative contribuant ainsi à sa forte expression. Nous avons impliqué les GS dans la stabilisation de l'ARNm p21 suite à l'inhibition du protéasome [44,47].

1.6.1. Le contrôle transcriptionnel de p21^{WAF1/CIP1} et sa relation avec p53

Notre environnement est constamment soumis à différents stress ou stimuli. Ces perturbations peuvent interagir avec la transmission de matériel génétique en introduisant des erreurs sous forme de mutations dans l'ADN. Cependant, pour lutter contre ces agressions, les cellules ont développé des procédés tels que l'emplacement de points de contrôles pouvant vérifier les dommages à l'ADN. Le suppresseur de tumeur p53, qui fut d'abord considéré comme un oncogène [120], est maintenant surnommé «gardien du génome» en raison de son implication dans la conservation de la stabilité du génome, protégeant ainsi le génome contre

les mutations. p53 est également impliqué dans les mécanismes de réparation à l'ADN. Le rôle de p53 dans la suppression des tumeurs se manifeste par le biais de ces points de contrôles en régulant la transactivation des autres facteurs du cycle cellulaire, dont le facteur p21^{WAF1/CIP1}. L'inhibition de la croissance cellulaire causée par l'activation de l'axe p53-p21 a été liée à deux domaines structuraux différents de p21: Le domaine inhibiteur de cycline CDK en N-terminal et le domaine de liaison à PCNA en C-terminal [108,121,122]. En se liant sur PCNA, p21 fait compétition avec l'ADN polymérase- δ dans le but d'inhiber directement la synthèse d'ADN [108,123]. Via son domaine N-terminal, p21 se lie aux kinases cycline-dépendantes (CDKs) CDK1 et CDK2, inhibant ainsi leurs activités. Conséquemment, la synthèse de protéines clés pour la réplication de l'ADN, telles que TERT et CDC2, est bloquée, provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire [108].

1.6.2. L'expression et la stabilisation de l'ARNm p21^{WAF1/CIP1}

Comme mentionné plus haut, l'induction de p21 suite aux stress métaboliques (ex : arsénite[47]) et les stress environnementaux (ex : radiations UV[124,125]) implique son activation transcriptionnelle. Cependant, la régulation à la hausse de p21 par le stress est également modulée via la stabilisation de son ARNm. En 1998, l'équipe du Dr. Gorospe a montré que l'induction de p21 par un traitement à courte longueur d'onde UV (UV-C) était due en partie à la stabilisation de son ARNm [124]. Plus tard, le même laboratoire a démontré que cette stabilisation de l'ARNm p21 par les UV-C avait été favorisée par une protéine de liaison à l'ARN de type Elav, nommée HuR. Toutefois, cette régulation de l'ARNm n'est pas restreinte aux UV-C. En 2007, le laboratoire du Dr Gallouzi a montré que p21 était régulé à la hausse via la stabilisation de son ARNm suite au traitement avec un inhibiteur de protéasome, le MG132. De manière intéressante, cette stabilisation de l'ARNm p21 corrèle avec sa relocalisation à l'intérieur des GS, indiquant un possible rôle des GS dans le contrôle de la demi-vie de l'ARNm p21, en condition d'inhibition du protéasome. Mes études ont confirmé le rôle des GS dans la stabilisation de l'ARNm p21, lors d'une inhibition du protéasome créé par l'agent chimio thérapeutique Bz. Dans cette étude, nous avons montré que l'inhibition du protéasome conduit à une augmentation transitoire, mais significative de l'ARNm p21, via son refuge dans les GS où il est protégé contre la dégradation et donc stabilisé. Sur ce, j'ai également identifié la protéine de liaison à l'ARN CUGBP1 comme responsable de la localisation, la stabilisation et l'accumulation de l'ARNm p21 dans les GS. Cependant, comment CUGBP1 régule l'accumulation de l'ARNm à l'intérieur des GS reste encore inconnu.

1.7. CUGBP1 (CELF1)

La protéine de liaison CUG (CUGBP1) fait partie de la famille des protéines de type Elav (CELF1). CUGBP1 est une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le développement et est surtout connue pour être associée à la dystrophie myotonique [126,127]. Les dystrophies myotoniques de type 1 (DM1) et de type 2 (DM2) sont des troubles multi systémiques progressifs, causés par des mutations génétiques, qui conduisent à une atrophie musculaire progressive [128]. CUGBP1 est impliqué dans l'apoptose et ce rôle a été décrit, à l'origine, par des études génétiques. Pour cela, le gène *CUGBP1* a été inactivé par recombinaison homologue chez les souris, où les cellules germinales ont été retirées puis étudiées [129]. Ces études ont montré que les cellules germinales dérivées de souris *CUGBP1*^{2/2} étaient plus sensibles à l'apoptose que les cellules de type sauvage [129]. Dans la cellule, CUGBP1 est à la fois nucléaire et cytoplasmique et donc son rôle dans l'apoptose pourrait alors impliquer à la fois des activités nucléaires ou cytoplasmiques. Dans le noyau, CUGBP1 régule l'épissage des ARN pré-messagers [130]. La proportion cytoplasmique de CUGBP1 participe à la dégradation des ARNms et influence la traduction de certains ARNms cibles [127,130]. Des études mutationnelles ont montré que CUGBP1 s'associe avec des ARNms cibles via leurs éléments riches en GU (GRE), qui sont souvent retrouvés dans la région 3'UTR de l'ARNm [131]. CUGBP1 contient trois domaines de liaison à l'ARN : RRM1, RRM2 et RRM3 [132] (Figure 1.13). Un autre domaine important de CUGBP1 est le domaine de liaison « *Linker* » qui est situé entre les domaines RRM2 et RRM3 [57]. En 2008, le domaine « *Linker* » a également été jugé important pour la relocalisation de CUGBP1 à l'intérieur de GS induites par de multiples différents stress environnementaux [57]. Ce domaine joue aussi un rôle essentiel dans la signalisation de la protéine, car il contient plusieurs sites de phosphorylation. Jusqu'à présent, les kinases connues pour cibler CUGBP1 incluent Akt, GSK3, Cdk4 et les isoformes PKC_{alpha/beta/gamma} (Figure 1.13).

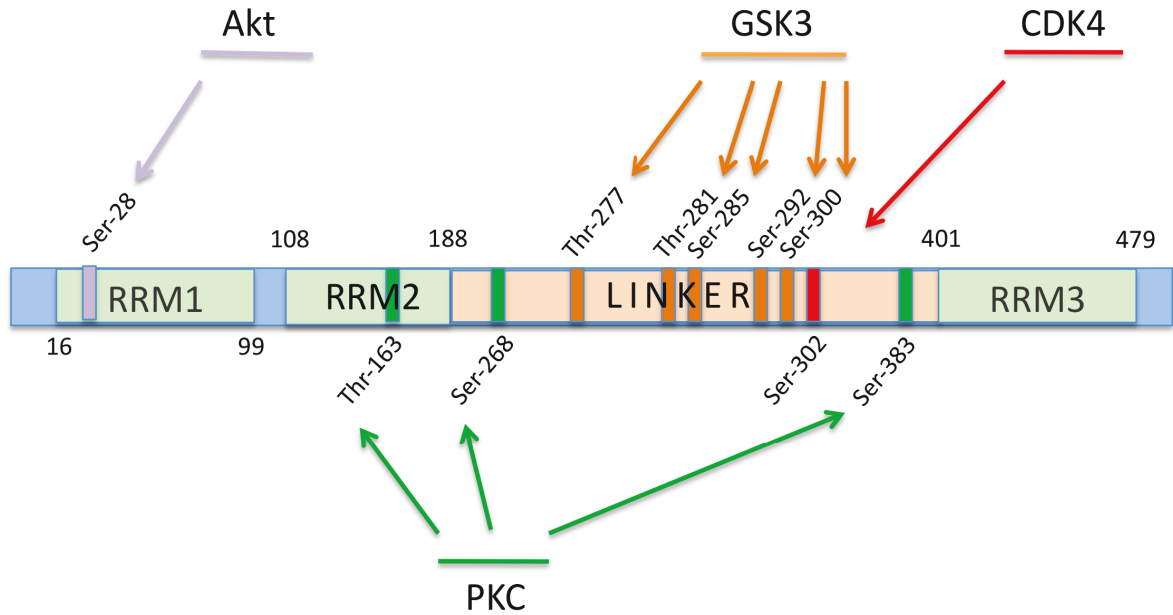


Figure 1-13 Schéma des domaines fonctionnels et des sites de phosphorylation de CUGBP1.

CUGBP1 contient trois domaines de liaison à l'ARN qui sont les suivants : RRM1, RRM2 et RRM3. Entre les domaines RRM2 et RRM3 se trouve le domaine « Linker ». Le domaine « Linker » joue potentiellement un rôle essentiel dans la signalisation de sa protéine, car il possède une grande quantité de sites de phosphorylation. Les principales kinases connues pour phosphoryler CUGBP1 sont : Akt, GSK3, CDK4 et les isoformes PKC α /b β /g γ .

En 1999, des études ont révélé des preuves démontrant que la phosphorylation de CUGBP1 est importante pour l'activité traductionnelle de ses ARNms cibles [132,133]. Un de ces ARNms importants, et connu pour être régulé par la phosphorylation de CUGBP1, est l'ARNm p21^{WAF1/CIP1}. Par exemple, chez les myocytes, CUGBP1 augmente la traduction de p21, et donc entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire [134]. Chez les myocytes, le mécanisme par lequel CUGBP1 favorise cette traduction de l'ARNm p21 implique sa phosphorylation sur la serine-302 via la cycline Cdk4 [135].

Par conséquent, selon le contexte et le type cellulaire, CUGBP1 possède des rôles différents. Cependant, un des traits importants de CUGBP1 qui reste constant, peu importe le type cellulaire ou le stress utilisé est sa capacité à se relocaliser à l'intérieur des GS, faisant de lui un marqueur classique des GS. Cette caractéristique de CUGBP1 implique alors celui-ci dans le stress cellulaire et même, comme il sera démontré, dans la survie cellulaire face aux traitements chimiothérapeutiques.

2. Hypothèses et objectifs

La chimiothérapie implique, de plus en plus, des complications pour les patients atteints du cancer. En effet, la résistance des tumeurs face aux traitements oncologiques est présentement un obstacle majeur en cancérologie. L'identification des mécanismes de résistance des cellules tumorales aux traitements est alors une étape primordiale pour arriver à combattre le cancer. Un mécanisme récemment identifié comme étant responsable d'une telle résistance est l'activation de la réponse au stress caractérisée par la formation des granules de stress. Les granules de stress sont des entités cytoplasmiques formées en réponse à différents stress cellulaires. La formation des granules de stress en réponse à un stress chimio thérapeutique demeurerait jusqu'à maintenant inconnue. Toutefois, il est connu que le stress cellulaire causé par l'inhibition du protéasome induit la formation des granules de stress. L'inhibition du protéasome est une technique utilisée couramment en chimiothérapie. Un exemple de ce type de traitement utilise un inhibiteur de protéasome tel que le bortezomib. Le bortezomib fut le premier inhibiteur de protéasome à être approuvé par la FDA et à être utilisé en clinique. Le bortezomib démontre une activité efficace contre les myélomes et les autres tumeurs hématologiques, toutefois, son utilisation contre les tumeurs solides présente des effets réfractaires.

Hypothèses : Nous suggérons que le bortezomib induit la formation des granules de stress. Ces granules de stress de par leur implication dans la survie cellulaire, protégeraient ces cellules cancéreuses contre le traitement létal qui leur est infligé causant la récurrence du cancer.

Objectifs : Dans un premier temps, la formation des granules de stress en réponse à un traitement chimio thérapeutique tel que le bortezomib doit être vérifiée. Suite à la vérification de cette formation des granules de stress dû à l'inhibition du protéasome, une caractérisation des mécanismes de formation de ces granules de stress serait importante afin de déterminer si ces granules sont des granules de stress classiques ou bien sont différentes et spécifiques à ce traitement. Dans un troisième temps, une relation entre la survie cellulaire des cellules cancéreuses face au bortezomib et la formation des granules de stress doit être étudiée. Finalement, les mécanismes engendrant la résistance des cellules cancéreuses face au traitement anti-cancer de bortezomib devront également être identifiés et étudiés pour mieux comprendre la possible implication des granules de stress dans la résistance des cellules cancéreuses face aux traitements chimio thérapeutiques.

Résultats: Nos études, présentées dans cette thèse, démontrent pour la première fois la formation de granules de stress dû à un agent chimio thérapeutique. De ceci, nous avons identifié une voie spécifique de formation de granules de stress chez les cellules cancéreuses en réponse à l'agent chimio thérapeutique bortezomib. En décortiquant cette voie spécifique de formation de granules de stress, nous avons pu observer de fortes

corrélations entre la résistance des cellules cancéreuses au traitement bortezomib et la formation de ces granules de stress. De cela nous avons identifié la kinase HRI, l'ARNm p21 et la protéine de liaison à l'ARN CUGBP1 comme étant des facteurs impliqués dans cette voie spécifique de formation des granules de stress promouvant la résistance cellulaire.

Conclusion: Nos études décrivent l'implication potentielle des granules de stress dans une nouvelle voie spécifique de résistance cellulaire contre le traitement chimio thérapeutique bortezomib.

3. Résultats

3.1. The Chemotherapeutic Agent Bortezomib Induces the Formation of Stress Granules.

The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules

Marie-Josée Fournier^{1,2}, Cristina Gareau^{1,2} and Rachid Mazroui^{1,2*}

*Corresponding author: Rachid Mazroui rachid.mazroui@crsfa.ulaval.ca

¹ Centre de recherche de l'hôpital St-François d'Assise (CHUQ/CRSFA), 10 rue de l'Espinay, Quebec, QC G1L 3L5, Canada

² Département de biologie médicale, Université Laval, Quebec, Canada

Authors' contributions

MJF and CG have equally contributed to this work.

The authors declare that they have no competing interests

For all author emails, please log on.

Cancer Cell International 2010, 10:12 doi:10.1186/1475-2867-10-12

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: <http://www.cancerci.com/content/10/1/12>

Received: 9 March 2010

Accepted: 29 April 2010

Published: 29 April 2010

© 2010 Fournier et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

3.1.1. Avant-Propos

Dans cet article publié en 2010 dans *Cancer Cell International*, pour lequel je suis co- première auteure, j'ai réalisé à part entière les figures 3.1 et 3.2 et participé à part égale avec Mme Marie-Josée Fournier à la réalisation des figures 3.3 et 3.4. J'ai également contribué de façon significative à la conception et à l'analyse de toutes les expériences requises pour cet article. De plus, j'ai participé à la rédaction et à la révision du papier avec le Dr. Mazroui.

3.1.2. Résumé

Dans cet article, nous avons caractérisé la formation des Granules de Stress (GS) induites suite à un traitement avec l'agent chimio thérapeutique Bortézomib (Velcade®). De ceci, nous avons pu délimiter une voie anti-apoptotique impliquant la formation des GS en réponse au Bortézomib. Nous avons trouvé que cette voie de formation des GS implique la phosphorylation du facteur eIF2a par l'entremise de l'activation de la kinase HRI. La déplétion du facteur HRI inhibe la formation des GS en réponse au Bortézomib et promeut l'apoptose. De ce fait, nous avons pu faire un lien entre la formation des GS et la chimiorésistance de plusieurs types de lignées cellulaires face au traitement de Bortézomib. Cette étude est la première de la sorte à décrire la formation des GS en réponse à un agent chimiothérapeutique, actuellement utilisé en clinique.

3.1.3. Abstract

Background

Cytoplasmic stress granules (SGs) are specialized storage sites of untranslated mRNAs whose formation occurs under different stress conditions and is often associated with cell survival. SGs-inducing stresses include radiations, hypoxia, viral infections, and chemical inhibitors of specific translation initiation factors. The FDA-approved drug bortezomib (Velcade®) is a peptide boronate inhibitor of the 26S proteasome that is very efficient for the treatment of myelomas and other hematological tumors. Solid tumors are largely refractory to bortezomib. In the present study, we investigated the formation of SGs following bortezomib treatment.

Results

We show that bortezomib efficiently induces the formation of SGs in cancer cells. This process involves the phosphorylation of translation initiation factor eIF2 α by heme-regulated inhibitor kinase (HRI). Depletion of HRI prevents bortezomib-induced formation of SGs and promotes apoptosis.

Conclusions

This is the first study describing the formation of SGs by a chemotherapeutic compound. We speculate that the activation of HRI and the formation of SGs might constitute a mechanism by which cancer cells resist bortezomib-mediated apoptosis.

3.1.4. Background

The proteasome is a large multi-subunit complex responsible for the degradation of various proteins, including cell cycle regulators and apoptotic factors, by ubiquitin-dependent and -independent mechanisms [1,2]. Proteasome inhibitors are known to induce apoptosis in proliferating cells [3-6]. The proteasome inhibitor bortezomib is now FDA-approved and in clinical use against mantle cell myeloma and multiple myeloma, against which it displays strong anti-tumor activity [7-14]. However, solid tumors of various histological origins are refractory to bortezomib treatment, and this resistance is also observed in cancer cell lines derived from solid tumors *in vitro* [7,15-17]. The mechanisms by which cancer cells resist bortezomib are still largely unknown, although that this resistance is thought to involve the activation of a general stress response [7,15-17].

When exposed to environmental stress, cells rapidly activate pathways generating a coordinated response involving mRNA translation and turnover, that confers protection against stress-induced damage and promotes their survival. Noxious conditions (e.g. heat shock, oxidative stress, UV radiations, viral infections, etc.) induce cellular arrest of translation initiation [18]. This translational block is largely due to phosphorylation of translation initiation factor eIF2 α [19]. Under normal growth conditions, eIF2 associates with initiator Met-tRNA^{Met} (aminoacylated initiator methionyl-tRNA) and GTP, and participates in the ribosomal selection of the start codon. As a prelude to the joining of the small and large ribosomal subunits, GTP complexed with eIF2 is hydrolysed to GDP, and eIF2-GDP is released from the translational machinery. The GDP-bound eIF2 is recycled to the active eIF2-GTP by a reaction catalyzed by the guanine nucleotide-exchange factor, eIF2B. Stress-induced phosphorylation of eIF2 α at Ser51 changes this translation factor from a substrate to an inhibitor of eIF2B. Since intracellular levels of eIF2B are approximately 10-20% of those of eIF2 in the cytoplasm, phosphorylation of as little as 10% of eIF2 α can be sufficient to sequester virtually all the available eIF2B, thereby blocking the nucleotide exchange activity of eIF2B and therefore inhibiting protein synthesis [20,21]. In metazoans, eIF2 α is known to be specifically phosphorylated at Ser51 by at least four kinases that monitor stress response [18], namely PKR, which is mainly activated by viral infection; protein kinase receptor-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), which is activated during endoplasmic reticulum stress; GCN2, a protein monitoring amino acid levels in cells and responding to amino acid deprivation and proteasome inhibition; and heme-regulated inhibitor kinase (HRI), which senses osmotic stress, heat shock and oxidative stress produced by arsenite. Stress-induced phosphorylation of eIF2 α inhibits translation

initiation by stalling translation initiation complexes in an inactive form. The accumulation of such stalled complexes is believed to promote the formation of stress granules [22-24].

Stress granules (SGs) are cytoplasmic ribonucleoprotein-containing bodies whose formation is favored by various stress conditions leading to eIF2 α phosphorylation. These include UV irradiation[25], hypoxia [26], arsenite [27-29], and viral infections [30,31]. Since these stress agents are known to inhibit translation initiation, it has been speculated that SGs might represent sites where translation of specific mRNAs is repressed [24]. SGs could repress translation in part by disrupting the interaction of mRNAs with translating ribosomes. A potential role of SGs in translation repression is supported by the observation that specific mRNAs are inefficiently repressed when RNA-binding proteins that contribute to SGs formation are altered [25,28,32-34]. SGs also contain small ribosomal subunits, translation initiation factors and signaling molecules [23,35]. Consistent with the proposed role of SGs as temporary storage or triage sites for untranslated mRNAs, large ribosomal subunits are absent from these foci [27]. Once the inducing stress is relieved, SGs gradually disassemble, which allows translation to resume, a condition essential for cell survival. It is thus postulated that the formation of SGs is central to the stress response by contributing to the reprogramming of gene expression which is essential for cell survival [23]. It is however only during the last few years that the pathological importance of SGs formation in cancer cell resistance to apoptosis became apparent. Indeed, the induction of SGs upon exposure to hypoxia [36], or oxidative stress (e.g. arsenite) [37] leads to tumor cell resistance to apoptosis. One underlying mechanism appears to involve the sequestration and inactivation of pro-apoptotic factors in SGs. The formation of SGs induced by hypoxia in cancer cells has been shown to inhibit apoptosis mediated by the anticancer drug etoposide. This effect was attributed to the sequestration of the signaling scaffold protein RACK1 into SGs, thus leading to the suppression of stress-responsive MAP kinase apoptotic pathways [36]. Other mechanisms by which SGs antagonize apoptosis could involve their sequestration of mRNAs encoding key anti-apoptotic factors, thus preventing degradation of the latter [25]. Although SGs have been shown to form following some types of radiotherapy, whether the formation of SGs can be triggered by chemotherapeutic agents such as bortezomib has not been investigated.

We have previously shown that the formation of SGs in response to the proteasome inhibitor MG132 involves phosphorylation of eIF2 α at Ser51 [33]. We found that mouse embryonic fibroblast (MEFs) eIF2 α ^{S51A}, in which eIF2 α Ser51 has been mutated to Ala, fail to form SGs upon MG132 treatment. We had also implicated the GCN2 kinase phosphorylating eIF2 α in the formation of those SGs. We reported that GCN2^{-/-} MEFs cells have decreased phosphorylation of eIF2 α and fail to assemble SGs following MG132 treatment. In the study herein, we now show that bortezomib efficiently induces the formation of SGs in cancer cells. This response involves the phosphorylation of eIF2 α by HRI, as shown by the inhibition of bortezomib-induced SGs upon HRI

depletion, which also promotes apoptosis. This is the first study describing the induction of SGs by a chemotherapeutic compound. We speculate that the activation of HRI and the resulting formation of SGs might constitute a mechanism by which cancer cells resist bortezomib-mediated apoptosis.

3.1.5. Results

Bortezomib induces the formation of SGs in cancer cells

We first assessed whether proteasome inhibition by bortezomib could induce the formation of SGs. Indeed, bortezomib (1 μ M, 3 h) efficiently induced SGs in HeLa cells, as assessed by immunofluorescence using various SG markers, namely fragile X mental retardation protein (FMRP), RasGAP-associated endoribonuclease (G3BP), the RNA-binding protein HuR, eIF4E, and fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 (FXR1) (Fig. 3.1A and 3.1E). Similar results were obtained using other cancer cells such as Calu-1 (lung cancer) and Caco (colon cancer) cells (see below and data not shown). In contrast, Hs578T breast cancer cells failed to form SGs in response to bortezomib (see below). Thus, the formation of SGs upon bortezomib treatment is not restricted to HeLa cells and does not occur in all cancer cells. As expected, the formation of SGs in HeLa cells correlated with a reduction of global translation as measured by metabolic labeling (Fig. 3.1B) and an induction of eIF2 α phosphorylation (Fig. 3.1C, top panel). Bortezomib-induced SGs are reversible since they disassemble following prolonged treatment with bortezomib (1 μ M, 10 h) (Fig. 3.1D-E), allowing a partial recovery of global translation (Fig. 3.1B). Intriguingly, the disassembly of SGs and the associated translation recovery do not require dephosphorylation of eIF2 α since phosphorylation of this factor remained high after prolonged bortezomib addition (Fig. 3.1C, top panel). Moreover, this disassembly of SGs was not a consequence of apoptosis, as assessed by the lack of activation of caspase-3, the main effector of caspase-dependent apoptosis (Fig. 3.1C, bottom panel), and negative results in the annexin V staining assay (Fig. 3.1F). The latter results indicate that HeLa cells are resistant to bortezomib-mediated apoptosis. Overall, our results show that bortezomib induces the formation of SGs.

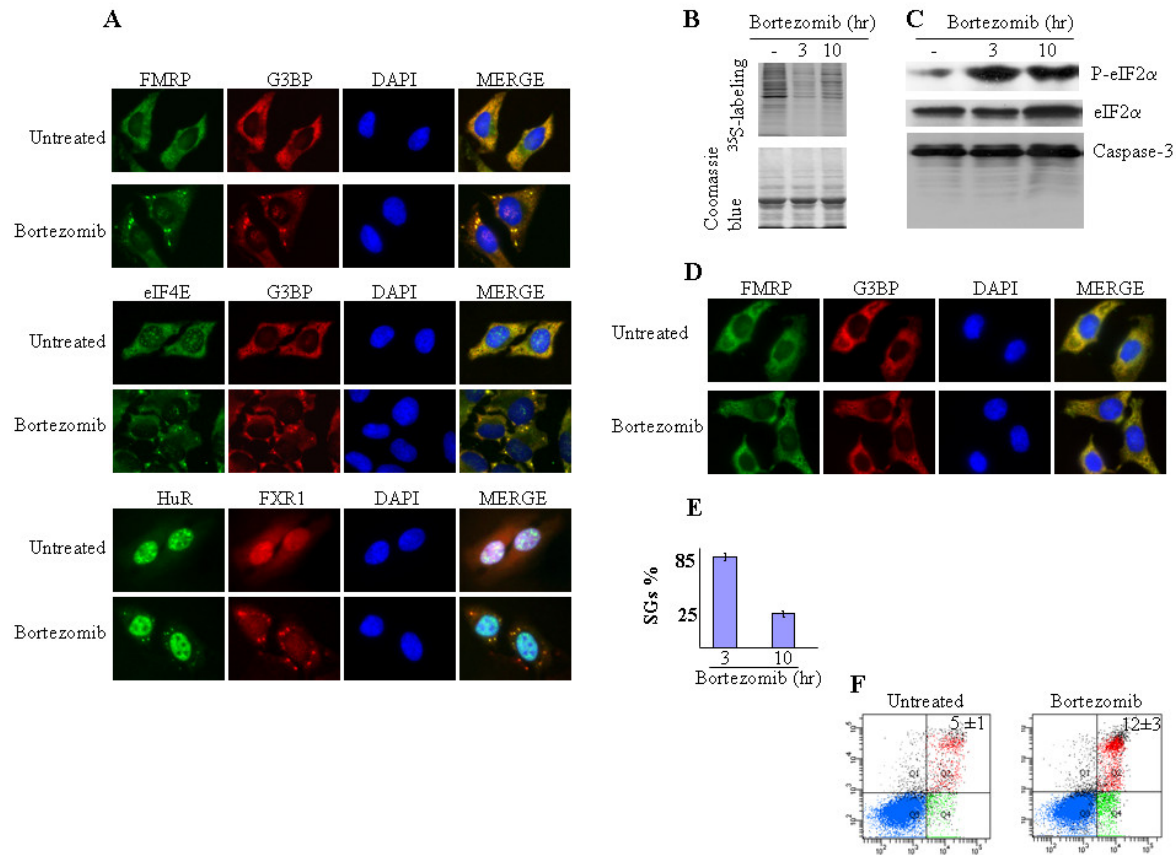


Figure 3-1 Bortezomib induces SG formation.

(A) HeLa cells were treated with 1 μ M bortezomib for 3 h, fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence using antibodies against different SG markers. DAPI is used as a marker for nuclei. Pictures were taken using a 100 \times objective. (B) HeLa cells were treated with 1 μ M bortezomib for the indicated times, then incubated with [³⁵S] methionine (50 μ Ci/ml) for another 30 min. Proteins were resolved on a SDS-polyacrylamide gel, stained with Coomassie Blue (bottom panel), and detected by autoradiography (top panel). (C) HeLa cells were treated with 1 μ M bortezomib for the indicated times, and the level of phospho-eIF2 α was analyzed by Western blotting using antibodies specific to the phosphorylated form (top panel). Detection of total eIF2 α levels is shown in the middle panel and serves as a loading control. The activation of caspase-3 was analyzed using anti-caspase-3 antibodies (bottom panel). (D) HeLa cells were treated with 1 μ M bortezomib for 10 h, fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence using antibodies against different SG markers. (E) The indicated histograms represent the percentage of cells harboring SGs (≥ 5 granules per cell) and is representative of the analysis of five different fields in three independent experiments for a total of 1000 cells. (F) Untreated HeLa cells or cells treated with bortezomib for 24 h were collected, stained with annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. The percentage of total dead or dying cells (indicated at the top of each panel) was defined as the sum of early (lower right box) and late (upper right box) apoptosis and is presented as the mean \pm SEM from 2 independent experiments.

Depletion of HRI prevents bortezomib-induced SGs

We have previously implicated the GCN2 kinase as being responsible for eIF2 α phosphorylation in the formation of SGs following MG132 treatment [33]. More recently, it was shown that HRI^{-/-} MEFs cells exhibit altered phosphorylation of eIF2 α in response to both MG132 and bortezomib [38]. Whether HRI, GCN2, or both are responsible for bortezomib-mediated eIF2 α phosphorylation, thus leading to the formation of SGs has

not been investigated in cancer cells. To address this question, we first assessed the formation of SGs upon depletion of HRI and GCN2. HeLa cells were treated with specific siRNAs directed against HRI (HRI-1), GCN2 (GCN2-1), or with a control siRNA. Due to the absence of suitable anti-HRI antibodies, we assessed the ability of HRI-1 to knock down its target mRNA using real-time quantitative reverse transcription (qRT)-PCR analysis. The results show that HRI-1 efficiently targeted HRI mRNA to degradation (Fig. 3.2A). GCN2-1 also efficiently depleted GCN2 mRNA as evidenced by (qRT)-PCR (Fig. 3.2B). The induction of SGs by bortezomib was then assessed by immunofluorescence using specific SGs markers (Fig. 3.2C). Less than 1% of cells treated with HRI siRNA displayed SGs in response to bortezomib. In contrast, more than 40% of GCN2-1-treated cells formed SGs upon bortezomib treatment. Control siRNA had a marginal effect on SGs formation since > 60% of the cells thus treated formed SGs following bortezomib treatment. These results indicate that HRI depletion prevents the induction of SGs by bortezomib. This effect of HRI depletion is likely due to altered eIF2 α phosphorylation as it significantly reduced the extent of eIF2 α phosphorylation induced by bortezomib (Fig. 3.2D). However, the phosphorylation of eIF2 α was not completely abolished in HRI-depleted cells following bortezomib treatment. This indicates that other kinases might contribute to the phosphorylation of eIF2 α induced by bortezomib, as shown by the slight reduction of that endpoint upon depletion of the GCN2 kinase (Fig. 3.2D). Our results indicate that under our conditions HRI is the major kinase involved in the phosphorylation of eIF2 α induced by bortezomib, with GCN2 also contributing to this modification. This minimal contribution of GCN2 could explain the residual eIF2 α phosphorylation observed in HRI-depleted cells. Residual phosphorylation of eIF2 α in HRI^{-/-} is however insufficient to trigger either the formation of SGs (Fig. 3.2C) or the inhibition of general translation (Fig. 3.2E). This suggests that a threshold in the extent of eIF2 α phosphorylation might be required to induce SGs upon treatment with bortezomib. Thus, the phosphorylation of eIF2 α seems to be involved in the formation of SGs which is induced by bortezomib. Our data clearly show that this process requires the activity of HRI.

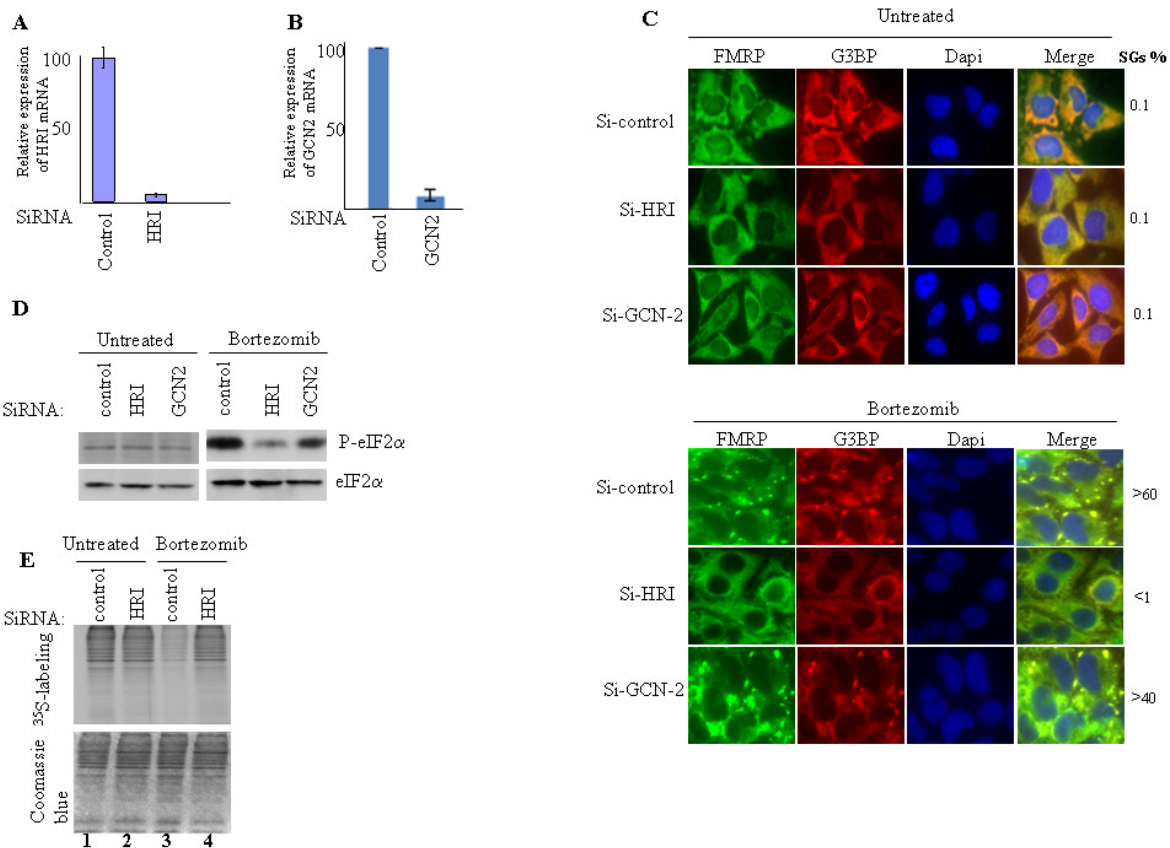


Figure 3-2 Reducing HRI levels by siRNA prevents bortezomib-induced SGs formation.

(A, C) HeLa cells were transfected for 48 h with anti-HRI (HRI-1) or anti-GCN2 siRNAs (GCN2-1), or with a control siRNA. (A, B) q(RT)-PCR of HRI (A) and GCN-2 mRNAs (B). Transfected cells were collected and their mRNA content was isolated. The amount of HRI and GCN-2 mRNAs relative to GAPDH mRNA was quantified by real-time q(RT)-PCR using the $\Delta\Delta C_t$ method. The results are presented as the mean of triplicate measurements, with error bars corresponding to the SEM. (C) Transfected cells were processed for immunofluorescence using antibodies against different SG markers, as above. (D) HeLa cells were transfected for 48 h with HRI-1, GCN2-1, or with a control siRNA, and then treated with bortezomib for 4 h. Cells were collected and protein extracts were analyzed by Western blot analysis for the amount of phospho- and total eIF2 α as described in Figure 3.1. (E) HeLa cells were transfected for 48 h with HRI-1 siRNA or with control siRNA, and then treated with bortezomib for 3 h before a 30-min incubation with [³⁵S] methionine (50 μ Ci/ml). Proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels, stained with Coomassie Blue (*bottom* panel), and detected by autoradiography (*top* panel).

HRI depletion promotes apoptosis following bortezomib treatment

Previous studies have reported that MEFs lacking HRI fail to form SGs following treatment with arsenite [39]. Quite significantly, HRI deficiency resulted in cell death during the recovery phase from arsenite treatment. Whether HRI can promote resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents has not been investigated. We next addressed the hypothesis that HRI depletion might sensitize HeLa cells to bortezomib-mediated apoptosis. To that purpose, HeLa cells treated with either HRI-1 or control siRNAs were exposed to bortezomib for 10 and 24 h, and apoptosis was then assessed by assaying caspase-3 activation and annexin

V staining. Depletion of HRI, which was confirmed by (qRT)-PCR, did not induce significant apoptosis *per se* (Fig. 3.3A-B). However, HRI depletion induced apoptosis in a high percentage of cells upon bortezomib treatment (Fig. 3.3A-B).

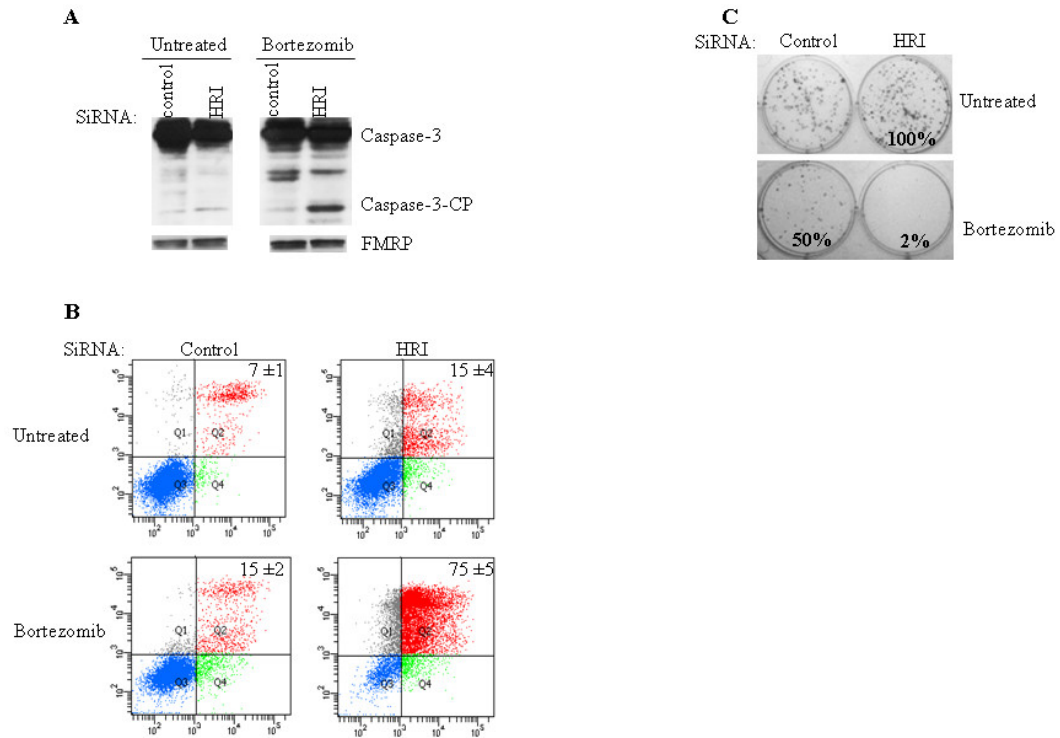


Figure 3-3 Reducing HRI levels by siRNA promotes bortezomib-mediated apoptosis.

(A) HeLa cells were transfected for 48 h with HRI-1 or control siRNA, treated with bortezomib for 24 h, and total extracted proteins were analyzed by Western blot using anti-caspase-3 antibodies (*top* panel). CP: cleaved product. FMRP serves as a loading control (*bottom* panel). (B) Following treatment with HRI-1 or control siRNA, HeLa cells were incubated with bortezomib for 24 h, then stained with annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. The percentage of total dead or dying cells (indicated at the top of each panel) was defined as the sum of early (lower right box) and late (upper right box) apoptosis and is presented as the mean \pm SEM from two independent experiments. (C) Following treatment with HRI-1 or control siRNA, HeLa cells were incubated with bortezomib for 24 h, trypsinized, counted, replated in the absence of drug, and incubated for 10 d. Before colony counting, cells were fixed and dried. Populations > 50 cells were counted as one surviving colony. Data were calculated as the percentage of surviving colonies relative to control (untreated) plates. The results are expressed as the mean of triplicate measurements.

To further confirm the role of HRI in promoting resistance of cancer cells to bortezomib-induced apoptosis, we performed clonogenic survival assays. For this, HeLa cells were treated with anti-HRI or control siRNAs, incubated with bortezomib and replated in fresh medium for 10 d, at which point colonies were counted. Depleting HRI significantly decreased cell survival and growth following treatment with bortezomib (Fig. 3.3C). Overall, the results identified HRI as an SGs-promoting factor that confers resistance to bortezomib-induced

apoptosis. Since SGs are known to antagonize apoptosis [24], our results suggest that HRI may promote cancer cell resistance to bortezomib, at least in part, by inducing SGs. One corollary of the latter finding is that cells which fail to form SGs following bortezomib treatment might become more susceptible to apoptosis. We assessed this hypothesis using Hs578T cells, which do not form SGs upon bortezomib treatment (Fig. 3.4A). HeLa and Calu-I cells were used as positive controls. As shown using caspase-3 activation and annexin V staining assays, bortezomib induces a high percentage of apoptosis in Hs578T cells while both HeLa and Calu-I cells are resistant to that treatment (Fig.3.4B-C). As expected, bortezomib-mediated apoptosis inhibited Hs578T cell growth after removing the drug, as evidenced by a clonogenic survival assay (Fig.3.4D). We obtained similar results using MDA-MB-231 human breast carcinoma cells which do not form SGs upon bortezomib treatment (data not shown). Thus, for the set of cell lines selected here, the formation of SGs in cancer cells correlates with their resistance to bortezomib.

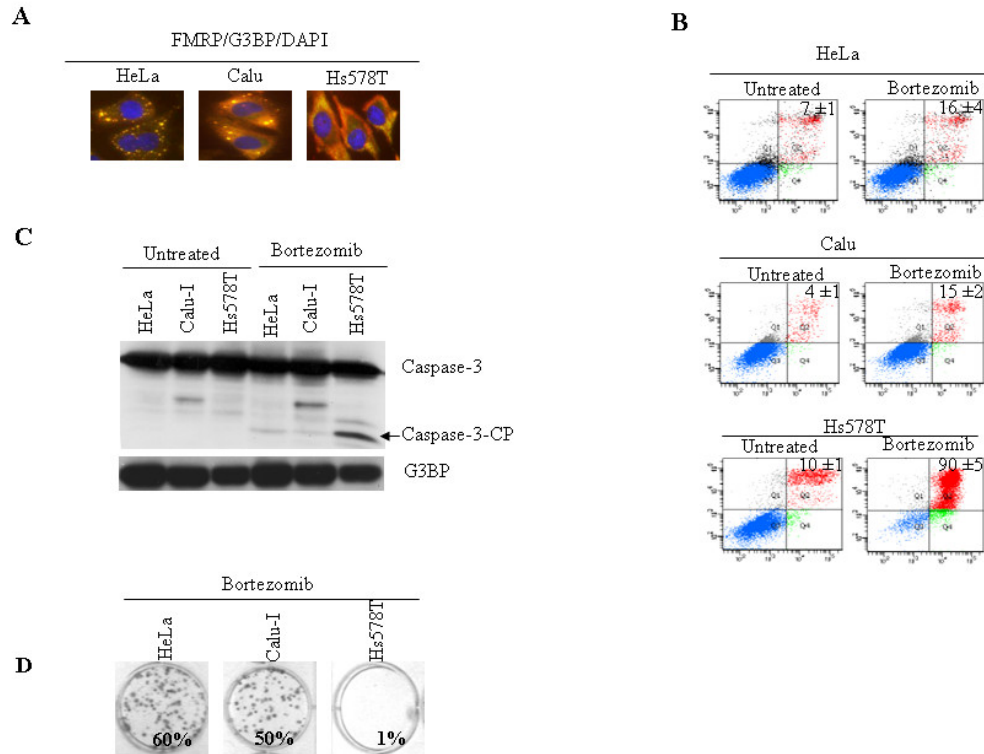


Figure 3-4 The formation of SGs correlates with resistance to bortezomib-mediated apoptosis.

HeLa, Calu-1, and Hs578T cells were treated with bortezomib for 3 h (A) or 24 h (B to D). (A) Cells were processed for immunofluorescence to detect SGs using anti-FMRP and anti-G3BP antibodies. (B) Cells were stained with annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. The percentage of total dead or dying cells (indicated at the top of each panel) was defined as the sum of early (lower right box) and late (upper right box) apoptosis and is presented as the means \pm SEM from two independent experiments. (C) Cells were harvested and protein extracts analyzed by Western blot for the activation of caspase-3 using anti-caspase-3 antibodies. G3BP serves as a loading control. (D) Following bortezomib treatment for 24 h, cells were trypsinized, replated in the absence of drug, and incubated for 10 d. Before colony counting, cells were fixed and dried. Populations > 50 cells were counted as one surviving colony. Data were calculated as the percentage of surviving colonies relative to untreated plates. The results are presented as the mean of triplicate measurements.

3.1.6. Discussion

The present study shows for the first time that bortezomib can induce the reversible formation of SGs in cancer cells. The formation of SGs is associated with a reduction of general mRNA translation, while their disassembly following extended incubation with bortezomib correlates with a partial recovery of general translation. SGs production also correlates with the phosphorylation of eIF2 α by HRI. Depletion of HRI blocks both the formation of SGs and the chemoresistance of cancer cells to bortezomib. Our studies unveil a specific survival pathway that involves HRI and the formation of SGs, which might be targeted to prevent cancer cell resistance to bortezomib-mediated apoptosis.

It is well known that under different stress conditions, eIF2 α phosphorylation triggers SGs formation [23]. Our present work demonstrates that depletion of HRI prevents the formation of SGs and decreases eIF2 α phosphorylation induced upon bortezomib treatment. However, although HRI depletion completely prevents the formation of SGs induced by bortezomib, it leaves a residual but significant amount of eIF2 α phosphorylation unaffected in that model. That residual level of eIF2 α phosphorylation could be due either to an incomplete suppression of HRI protein synthesis, or to the activation of the GCN2 kinase, although we cannot exclude the possible contribution of the other eIF2 α kinases [23]. Notwithstanding these observations, the residual phosphorylation of eIF2 α observed in HRI-depleted cells treated with bortezomib is clearly insufficient for triggering the formation of SGs. One possibility is that initiating the formation of SGs requires a minimum threshold of eIF2 α phosphorylation. Another possibility is that, in the bortezomib model, HRI might promote the formation of SGs via mechanisms other than or in addition to eIF2 α phosphorylation. We and others have described the inactivation of the translation initiation factor eIF4A as an alternative pathway for the induction of SGs which occurs independently of eIF2 α phosphorylation and in absence of any additional stress [30,40]. We subsequently found that inactivation of other translation initiation factors also induces the formation of SGs in absence of stress [41]. In this context, it is tempting to speculate that HRI may affect other, as yet unknown translation initiation factors in addition to phosphorylating eIF2 α , thus triggering the formation of SGs upon bortezomib treatment. Other pathways whose inactivation impairs the induction of SGs by stress agents also include microtubule polymerization and the acetylglucosamination (O-GlcNAc) modification of ribosomal proteins [24]. It will be interesting to investigate the role of these pathways in the formation of SGs and test if HRI depletion could affect those pathways in cells treated with bortezomib.

Previous studies have shown that HRI-deficient MEFs fail to form SGs upon arsenite treatment [39]. This effect of HRI knockout is physiologically relevant since it resulted in massive cell death during the recovery phase from arsenite treatment [39]. However, this model was not investigated in cancer cells, and more

importantly, the role of HRI activation in chemoresistance to bortezomib had never been addressed. Our work has thus unveiled a critical role of HRI in promoting cancer cell resistance to bortezomib, at least in part via the induction of SGs. HRI is known to be highly expressed in erythroid cells, although minimal expression of HRI is also found in a wide range of non-erythroid cells [42,43]. It is thus intriguing that HRI plays a critical role in promoting resistance of non-erythroid cells such as HeLa to apoptosis. One possibility is that the expression and/or activation of HRI might be altered in cancer cells of non-erythroid origin. Our q(RT)-PCR analysis indicates that HRI mRNA is indeed abundant in HeLa cells and its high expression remains unaltered by bortezomib treatment (data not shown). It will be interesting to compare the expression of HRI in bortezomib-resistant and -sensitive cancer cells. The mechanism of HRI activation by bortezomib is currently unknown but may involve an interaction with heat shock proteins. Hsp70 and Hsp90 are two heat shock proteins which act as molecular chaperones to modify the conformation of other proteins [44]. In reticulocytes, Hsp70 and Hsp90 were shown to activate HRI following arsenite treatment [45]. In addition to their role of chaperones, overexpression of Hsp70 and Hsp90 in cancer cells confers protection against apoptosis. However, depletion of the inducible form of Hsp70 (Hsp72) does not impair the induction of SGs by bortezomib (data not shown), indicating that this protein may not be involved in the activation of HRI under our conditions. The role of Hsp90 in promoting bortezomib-induced HRI activation, and the formation of SGs remains to be investigated.

How could the formation of SGs promote cancer cell resistance to bortezomib-mediated apoptosis? SGs could enhance this survival pathway by sequestering untranslated mRNAs to free the ribosomes needed for the efficient and rapid translation of mRNAs encoding anti-apoptotic factors [22]. In addition, SGs might promote tumor cell survival by preventing the degradation of mRNAs encoding key survival proteins, as reported by Moeller *et al.* [25]. In the latter study, it was shown that radiotherapy induces the formation of SGs where mRNAs encoding anti-apoptotic cytokines such as VEGF are recruited and accumulated. Following reoxygenation, however, SGs disassemble, thus releasing those mRNAs that are then translated in large amounts. The ensuing overproduction of cytokines then causes radioresistance of the tumor and its subsequent regrowth. This mechanism could also explain the effects of depleting two SGs-promoting factors, TIA and HDAC6, in preventing cell survival. In these studies, depletion of either TIA or HDAC6 was shown to prevent arsenite-induced SGs formation, thus promoting apoptosis during recovery from arsenite treatment [37,39]. Other mechanisms by which SGs prevent cancer cell resistance to bortezomib might involve the sequestration and inactivation of key apoptotic signaling molecules such as RACK1 or TRAF2 [36,46], thus preventing the initiation of apoptotic cascades. Clearly, further studies are needed to determine if the formation of SGs is a key pathway leading to chemoresistance to bortezomib.

3.1.7. Conclusions

The present study has established HRI as a critical factor promoting chemoresistance *in vitro*. Consideration should be taken about developing compounds to target HRI, which could be combined with bortezomib to treat chemoresistant cancers. We also provide a framework for further documenting the therapeutic relevance of targeting the formation of SGs as a new tool to chemosensitize cancer cells.

3.1.8. Methods

Cell lines and culture

HeLa, Calu-1 (lung cancer), and Hs 578T (breast cancer) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. All supplements for cell culture were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Drugs and drug treatments

Bortezomib was purchased from LC Laboratories and dissolved in DMSO to a 65 mM stock solution, and stored at -20°C. Bortezomib treatment was performed when cells had reached 60-80% confluence.

[³⁵S]Methionine labelling

Cells in 6-well plates were labeled for 30 min with 1 ml methionine-free DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µCi/ml of [³⁵S] methionine (Easy Tag, PerkinElmer/NEN Radiochemicals).

Antibodies

Anti-caspase-3, phospho-specific anti-eIF2 α and the pan anti-eIF2 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-HuR, anti-G3BP, anti-FMRP, anti-FXR1, and anti-eIF4E have been previously described [30,33,41].

siRNA transfections

All siRNAs were purchased from Dharmacon. siRNA transfections were performed in HeLa cells essentially as previously documented [47] using Hiperfect reagent according to the manufacturer's protocol (Qiagen and Dharmacon). Twenty-four hours before transfections, cells were trypsinized and plated to obtain 60-80% confluence the day after. For a 6-well plate, annealed duplexes were used at a final concentration of 50 nM. Forty eight hours post-transfection, cells were either fixed and processed for immunofluorescence or harvested for protein and mRNA extraction.

Fluorescence microscopy

Immunofluorescence experiments were performed as previously described [29]. Briefly, following fixation and permeabilization, cells were incubated with primary antibodies diluted in 0.1% Tween-20 in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature. After washing, cells were incubated with goat anti-mouse/rabbit IgG (H+L) secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488/594. Fluorescence was visualized using an Olympus fluorescence microscope equipped with AxioCam HR digital camera and the the Axiovision acquisition software. Images were compiled using Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Real-time quantitative RT-PCR

RT-PCR reactions were performed using the Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen). Each reaction was performed by mixing 2 μ l of RNA at 500 ng/ μ l, 10 μ l of RNase-free water, 2 μ l of gDNA Wipeout Buffer 7 \times , 4 μ l of Quantiscript RT Buffer 5 \times , 1 μ l of RT Primer Mix and 1 μ l of Quantiscript Reverse Transcriptase.

Real-time PCR reactions were carried out using the Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) in a total volume of 25 μ l: 12.5 μ l of PCR Master Mix, 0.67 μ l of forward primer at 3.75 μ M, 0.67 μ l of reverse primer at 3.75 μ M, 9.2 μ l of deionized water and 2 μ l of RT-PCR. Reactions were run and data analyzed on the MX3000 QRT PCR system (Applied Biosystems) with a 4-stage program: first stage: 2-min incubation at 50°C; second stage: 10-min incubation at 95°C, followed by a 2-step reaction in the third stage: 95°C \times 15 s and 55°C \times 60 s for 40 cycles; and a fourth stage made of a 3-step reaction (95°C \times 15 s, 60°C \times 20 s and 95°C \times 15 s).

For preparing templates for the HRI mRNA, the oligonucleotide pairs used were: 5'-GCCCTGATCAGCCAAGTAAAA-3' (forward primer), and 5'-TCTGGACGAGTATGTGTTGGTG-3' (reverse primer). For preparing templates for the GCN2 mRNA, the oligonucleotide pairs used were: 5'-CAAGGCCTAACTGGTGAAGA-3' (forward primer), and 5'-AGGTAGGTGGGCATTTAACC-3' (reverse primer). For preparing templates for the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, the oligonucleotide pairs used were: 5'-ACGACCACTTTGTCAAGCTC-3' (forward primer), and 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' (reverse primer).

Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide assay

Following treatments, both adherent and detached cells were harvested. Cells were washed with ice-cold PBS, then pelleted again at 1500 rpm for 10 min at 4°C, and resuspended in ice-cold binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). The cells were subsequently stained with annexin V-

fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) for 15 min in the dark. A total of 50,000 cells were counted, and dead cells were analyzed by flow cytometry.

Clonogenic survival assay and annexin V analysis

Cells were plated in duplicate and incubated for 24 h. Following treatments, cells were washed with PBS, trypsinized, counted, replated (1×10^3 cells per well in 6-well plates) in the absence of drug, and incubated for 10 d. Before colony counting, cells were washed with PBS, stained with 0.1% (w/v) crystal violet in PBS containing 0.0037% (v/v) formaldehyde, rinsed with deionized water and dried. Populations > 50 cells were counted as one surviving colony.

3.1.9. Acknowledgements

We are grateful to Drs. Yves Labelle and Richard Poulin for providing helpful discussions and for editing the manuscript. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-IC093226), an infrastructure grant from the Canada Foundation for Innovation (MOP-GF091050) and a start-up fund from the Centre Hospitalier Universitaire de Québec-Centre de recherche de l'hôpital St-François d'Assise (CHUQ-CRSFA) to RM. RM is the recipient of a Junior 1 Scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

3.1.10. References

1. Adams J: **The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs.** *Cancer Cell* 2004, **5**(5):417-421.
2. Adams J: **The proteasome: a suitable antineoplastic target.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(5):349-360.
3. Drexler HC: **Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(3):855-860.
4. Imajoh-Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S, Tanaka K, Omura S, Kikuchi H: **Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **217**(3):1070-1077.
5. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM: **p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors.** *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(20):12893-12896.
6. Sloss CM, Wang F, Liu R, Xia L, Houston M, Ljungman D, Palladino MA, Cusack JC Jr: **Proteasome inhibition activates epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR-independent mitogenic kinase signaling pathways in pancreatic cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(16):5116-5123.
7. McConkey DJ, Zhu K: **Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer.** *Drug Resist Updat* 2008, **11**(4-5):164-179.
8. Richardson PG: **A review of the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma.** *Expert opinion on pharmacotherapy* 2004, **5**(6):1321-1331.
9. Richardson PG, Anderson KC: **Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma.**

- Clin Adv Hematol Oncol* 2003, **1**(10):596-600.
10. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, *et al.*: **A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma.**
The New England journal of medicine 2003, **348**(26):2609-2617.
 11. Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC: **Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers.**
Cancer Control 2003, **10**(5):361-369.
 12. Richardson PG, Hideshima T, Mitsiades C, Anderson K: **Proteasome inhibition in hematologic malignancies.**
Annals of medicine 2004, **36**(4):304-314.
 13. Richardson PG, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, Munshi N, Anderson KC: **Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma.**
Expert Rev Anticancer Ther 2008, **8**(7):1053-1072.
 14. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O: **The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy.**
Expert opinion on investigational drugs 2008, **17**(6):879-895.
 15. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, *et al.*: **Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells.**
Molecular cancer therapeutics 2006, **5**(3):665-675.
 16. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC: **Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer.**
J Clin Oncol 2005, **23**(3):630-639.
 17. Tang ZY, Wu YL, Gao SL, Shen HW: **Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells.**
The Journal of surgical research 2008, **145**(1):111-123.
 18. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG: **Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.**
Biochem Soc Trans 2006, **34**(Pt 1):7-11.
 19. Holcik M, Sonenberg N: **Translational control in stress and apoptosis.**
Nature reviews 2005, **6**(4):318-327.
 20. Barber GN: **The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death.**
Cell death and differentiation 2005, **12**(6):563-570.
 21. Lu L, Han AP, Chen JJ: **Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses.**
Molecular and cellular biology 2001, **21**(23):7971-7980.
 22. Anderson P, Kedersha N: **Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation.**
Cell Stress Chaperones 2002, **7**(2):213-221.
 23. Anderson P, Kedersha N: **Stress granules: the Tao of RNA triage.**
Trends in biochemical sciences 2008, **33**(3):141-150.
 24. Buchan JR, Parker R: **Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation.**
Molecular cell 2009, **36**(6):932-941.
 25. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW: **Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules.**
Cancer Cell 2004, **5**(5):429-441.
 26. Gardner LB: **Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response.**
Molecular and cellular biology 2008, **28**(11):3729-3741.

27. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P: **Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules.**
Molecular biology of the cell 2002, **13**(1):195-210.
28. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P: **Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules.**
J Cell Biol 2000, **151**(6):1257-1268.
29. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW: **Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression.**
Human molecular genetics 2002, **11**(24):3007-3017.
30. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, Tanaka J, Gallouzi I, Pelletier J: **Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation.**
Molecular biology of the cell 2006, **17**(10):4212-4219.
31. McInerney GM, Kedersha NL, Kaufman RJ, Anderson P, Liljestrom P: **Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation.**
Molecular biology of the cell 2005, **16**(8):3753-3763.
32. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P: **Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1.**
Molecular biology of the cell 2004, **15**(12):5383-5398.
33. Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE: **Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation.**
Molecular biology of the cell 2007, **18**(7):2603-2618.
34. Tsai NP, Ho PC, Wei LN: **Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway.**
The EMBO journal 2008, **27**(5):715-726. Anderson P, Kedersha N: **RNA granules.**
J Cell Biol 2006, **172**(6):803-808.
35. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M: **Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways.**
Nature cell biology 2008.
36. Kwon S, Zhang Y, Matthias P: **The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response.**
Genes & development 2007, **21**(24):3381-3394.
37. Yerlikaya A, Kimball SR, Stanley BA: **Phosphorylation of eIF2alpha in response to 26S proteasome inhibition is mediated by the haem-regulated inhibitor (HRI) kinase.**
The Biochemical journal 2008, **412**(3):579-588.
38. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ: **Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure.**
The Journal of biological chemistry 2005, **280**(17):16925-16933.
39. Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, Kaufman R, Anderson P, Liu JO: **Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A.**
The Journal of biological chemistry 2006, **281**(43):32870-32878.
40. Mokas S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, Arya P, Kaufman RJ, Pelletier J, Mazroui R: **Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition.**
Molecular biology of the cell 2009, **20**(11):2673-2683.
41. Berlanga JJ, Herrero S, de Haro C: **Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells.**

- The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(48):32340-32346.
42. Mellor H, Flowers KM, Kimball SR, Jefferson LS: **Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase. Evidence for multitissue expression.**
The Journal of biological chemistry 1994, **269**(14):10201-10204.
43. Jolly C, Morimoto RI: **Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.**
Journal of the National Cancer Institute 2000, **92**(19):1564-1572.
44. Lu L, Han AP, Chen JJ: **Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses.**
Molecular and cellular biology 2001, **21**(23):7971-7980.
45. Kim WJ, Back SH, Kim V, Ryu I, Jang SK: **Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions.**
Molecular and cellular biology 2005, **25**(6):2450-2462.
46. Mazroui R, Di Marco S, Clair E, von Roretz C, Tenenbaum SA, Keene JD, Saleh M, Gallouzi IE: **Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis.**
J Cell Biol 2008, **180**(1):113-127.

3.2. p21^{WAF1/CIP1} Upregulation through the Stress Granule-Associated Protein CUGBP1 Confers Resistance to Bortezomib-Mediated Apoptosis

p21WAF1/CIP1 Upregulation through the Stress Granule-Associated Protein CUGBP1 Confers Resistance to Bortezomib-Mediated Apoptosis

Cristina Gareau, Marie-Josée Fournier, Christine Filion, Laetitia Coudert, David Martel, Yves Labelle, Rachid Mazroui*

Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry, and Pathology, Faculty of Medicine, Laval University, CHUQ Research Centre/St-François d'Assise Research Centre (CRCHUQ/CRSFA), Quebec, Canada

Citation: Gareau C, Fournier M-J, Filion C, Coudert L, Martel D, et al. (2011) p21WAF1/CIP1 Upregulation through the Stress Granule-Associated Protein CUGBP1 Confers Resistance to Bortezomib-Mediated Apoptosis. PLoS ONE 6(5): e20254. doi:10.1371/journal.pone.0020254

Editor: Sue Cotterill, St. Georges University of London, United Kingdom

Received December 22, 2010; Accepted April 28, 2011; Published May 26, 2011

Copyright: 2011 Gareau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grants (CIHR) (MOP-IC093226 and MOP-096454) and a Canadian Foundation for Innovation (CFI) grant (MOP-GF091050) to R. Mazroui. C. Gareau is recipient of a scholarship from the Faculty of Medicine at Laval University. R. Mazroui is a recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) research Scholars-Junior 1, and is a new investigator of CIHR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rachid.mazroui@crsfa.ulaval.ca

3.2.1. Avant-Propos

Dans cet article publié en 2011 dans le journal PLoS ONE, pour lequel je suis première auteure, j'ai réalisé les figures 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 et les figures supplémentaires 3.10, 3.11, 3.13, 3.14 et 3.16. Dans cet article, j'ai contribué de manière significative à la conception et à l'analyse de toutes les expériences requises pour cet article. De plus, j'ai participé à la rédaction et à la révision du papier avec le Dr Mazroui.

3.2.2. Résumé

p21^{WAF1/CIP1} est un inhibiteur de kinase cycline-dépendante connu pour être fortement induit par différents stress, selon lesquels p21 peut soit favoriser l'apoptose ou la survie cellulaire. La surexpression de p21 suite au stress implique sa régulation post-transcriptionnelle, qui inclue la stabilisation de son ARNm.

Dans ce travail, nous avons identifié la protéine CUGBP1 comme une composante des GS nécessaire à la stabilisation de l'ARNm p21 suite au traitement de Bortézomib (PS-341/Velcade). Cet inhibiteur de protéasome est très efficace pour le traitement des myélomes et autres tumeurs hématologiques, mais semble être réfractaire aux tumeurs solides. Nous avons constaté que la déplétion de CUGBP1 dans les cellules cancéreuses inhibe la surexpression de p21, en empêchant sa relocalisation à l'intérieur des GS, suite au traitement du Bortézomib. L'inhibition de l'expression de p21, soit par la déplétion de CUGBP1 ou p21, favorise l'apoptose induite par le Bortézomib.

Nous proposons que l'activation de la voie CUGBP1-p21, associée à la formation des GS, est un mécanisme clé de résistance des cellules cancéreuses contre l'apoptose induite par le Bortézomib.

3.2.3. Abstract

Background: p21^{WAF1/CIP1} is a well-known cyclin-dependent kinase inhibitor induced by various stress stimuli. Depending on the stress applied, p21 upregulation can either promote apoptosis or prevent against apoptotic injury. The stress-mediated induction of p21 involves not only its transcriptional activation but also its posttranscriptional regulation, mainly through stabilization of p21 mRNA levels. We have previously reported that the proteasome inhibitor MG132 induces the stabilization of p21 mRNA, which correlates with the formation of cytoplasmic RNA stress granules. The mechanism underlying p21 mRNA stabilization, however, remains unknown.

Methodology/Principal Findings: We identified the stress granules component CUGBP1 as a factor required for p21 mRNA stabilization following treatment with bortezomib (PS-341/Velcade). This peptide boronate inhibitor of the 26S proteasome is very efficient for the treatment of myelomas and other hematological tumors.

However, solid tumors are sometimes refractory to bortezomib treatment. We found that depleting CUGBP1 in cancer cells prevents bortezomib-mediated p21 upregulation. FISH experiments combined to mRNA stability assays show that this effect is largely due to a mistargeting of p21 mRNA in stress granules leading to its degradation. Altering the expression of p21 itself, either by depleting CUGBP1 or p21, promotes bortezomib-mediated apoptosis.

Conclusions/Significance: We propose that one key mechanism by which apoptosis is inhibited upon treatment with chemotherapeutic drugs might involve upregulation of the p21 protein through CUGBP1.

3.2.4. Introduction

The proteasome is a large multi-subunit complex responsible for the degradation of various proteins, including cell cycle regulators and apoptotic factors, via both ubiquitin-dependent and -independent mechanisms [1], [2]. Incubation of proliferating cells with proteasome inhibitors induces apoptosis [3]–[6]. The proteasome inhibitor bortezomib has recently been approved for clinical use, showing strong antitumor activity in multiple myeloma and other hematological tumors [7], [8]. However, solid tumors of different organ origins are refractory to bortezomib, and this resistance is also observed in cancer cell lines derived from solid tumors [9]–[12]. The mechanisms by which cancer cells resist to bortezomib are still largely unknown, although it is postulated that this resistance might involve the activation of a general stress response [9]–[13].

We have recently reported the formation of stress granules following treatment with bortezomib [14]. Stress granules (SG) are cytoplasmic bodies whose formation is induced by various types of stress such as ionizing radiations [15], hypoxia [16], viral infection [17], [18], and proteasome inhibitors [14], [19], [20]. Since such stress stimuli are known to inhibit translation initiation, it was speculated that SG represent sites where the translation of specific mRNAs is repressed [21]–[24]. SG might repress translation in part by limiting the interaction of mRNAs with ribosomes [21], [22]. The potential role of SG in translation repression is supported by several reports showing that specific mRNAs are inefficiently repressed when RNA-binding proteins, which contribute to SG formation, are altered [15], [18], [20], [25], [26]. These foci also contain small ribosomal subunits, translation initiation factors and signaling molecules [21], [27]. In accordance with the proposed role of SG as storage sites for untranslated mRNAs, these foci are devoid of large ribosomal subunits [28]. Once the stress is relieved SG gradually disassemble, leading to the recovery of translation required for cell survival. It is thus postulated that SG formation is central to the stress response, which reprograms gene expression towards the synthesis of proteins that are essential to allow cells to cope with stress and thus survive [21]. Indeed, the induction of SG upon exposure to hypoxia [29], oxidative stress (e.g. arsenite) [19], or bortezomib treatment [14] leads to resistance of tumor cells to apoptosis. One mechanism underlying such resistance

appears to involve the sequestration and inactivation of pro-apoptotic factors such as RACK1 and TRAF2 in SG [29]–[31]. Other mechanisms by which SG may antagonize apoptosis could involve the sequestration of mRNA encoding key anti-apoptotic factors within SG, thereby preventing their degradation. Although such mechanisms have not been formally demonstrated, evidence nevertheless exists suggesting a role for SG in the regulation of mRNAs encoding anti-apoptotic proteins [15], [20], [32].

We and others have previously suggested a potential role of SG in the regulation of one such antiapoptotic factor, namely the expression of p21^{WAF1/CIP1} mRNA [20], [32]. p21 is a well-known cyclin-dependent kinase inhibitor induced following various stress stimuli, including proteasome inhibitors. As a proliferation inhibitor, p21 was suggested to play a role in tumor suppression by promoting cell cycle arrest or by inducing apoptosis [33]–[36]. Conversely, other laboratories reported that stress-induced upregulation of p21 can protect tumor cells from apoptosis [37]–[41]. Whether p21 upregulation promotes resistance to apoptosis mediated by proteasome inhibitors in cancer cells is currently unknown. It is well established that stress-mediated upregulation of p21 involves transcriptional mechanisms. Other studies indicate that p21 expression is also regulated post-transcriptionally, mainly at the level of mRNA stability, in response to various SG-inducing stress stimuli such as UV radiation [42], [43] and oxidative stress [32]. We have previously shown that the proteasome inhibitor MG132 induces the sequestration of p21 mRNA into SG, which correlates with its stabilization [20].

Due to its short half-life, p21 mRNA is expressed at very low levels under normal growth conditions [20], [42], [43]. We showed that treatment of HeLa cells for 3 to 6 h with proteasome inhibitors such as MG132 or lactacystin induces both SG formation and p21 mRNA accumulation, due in part to stabilization of the latter [20].

CUGBP1 belongs to the CELF family of RNA binding proteins and is aberrantly expressed in myotonic dystrophy type I [44]–[46]. CUGBP1 controls mRNA splicing in the nucleus. In the cytoplasm, CUGBP1 was shown to promote either mRNA decay [44], [47]–[52] or translation of its associated mRNAs [44]–[46], [53]. The translational function of CUGBP1 has been investigated in normal cells. These studies showed that CUGBP1 increases p21 translation in myocytes, thereby leading to their differentiation [46], [53], and in aged normal fibroblasts, where it results in a senescent-like phenotype [54]. The role of CUGBP1 in apoptosis was unsuspected until recently. Kress and coll. generated mice in which the *Cugbp1* gene was inactivated by homologous recombination [55]. Although *Cugbp1*^{-/-} mice are viable, they display significant perinatal mortality and growth retardation. Moreover, germ cells derived from *Cugbp1*^{-/-} mice are more prone to apoptosis than wild-type cells [55]. Recent studies have shown that CUGBP1 accumulates into SG following arsenite treatment, indicating that CUGBP1 might play a role in cellular stress response [32], [56].

In the study herein, we identified CUGBP1 as a factor required for p21 mRNA stabilization upon bortezomib treatment. We show here that CUGBP1 accumulates into SG following bortezomib treatment, together with its associated p21 mRNA. Upon depletion of CUGBP1, bortezomib-mediated p21 mRNA localization in SG and therefore its stabilization are lost, thereby leading to its misexpression. Altering the expression of p21 either by depleting CUGBP1 or p21 itself promotes bortezomib-mediated apoptosis. Our study unveils p21 as a potential therapeutic target.

3.2.5. Results

Bortezomib induces p21 mRNA accumulation followed by its translation

We have previously shown that bortezomib induces the reversible formation of SG [14]. We therefore analyzed the expression of p21 during the assembly and disassembly of SG following bortezomib addition. In HeLa cells, SG formation, which occurred 4 h after bortezomib treatment (Fig. 3.5A; center panel) correlated with a drastic increase in the steady-state level of p21 mRNA (Fig. 3.5B). Time course analysis of SG formation shows that the percentage of cells, forming SG, remains high between 4 and 7 h of bortezomib treatment. (Fig. 3.10A). At those stages, however, p21 mRNA was not being efficiently translated (Fig. 3.5C and Fig. 3.10B), despite its sustained accumulation (Fig. 3.10C). Prolonged treatment with bortezomib (10 h) resulted in complete SG disassembly (Fig. 3.5A; bottom panel, and Fig. 3.10A) and concomitant efficient p21 protein production (Fig. 3.5C and Fig. 3.10B), despite some reduction (30–40%) in p21 mRNA level (Fig. 3.5B). We obtained similar results using two other cell lines, namely the MCF-7 human breast carcinoma and Calu-1 human lung carcinoma cells (Fig. 3.11A–B). We next used immunofluorescence to corroborate our results of p21 expression. We found that p21 was below the detection threshold in untreated cells or upon treatment with bortezomib for 4 h (Fig. 3.5D; top and center panels, respectively, and Fig. 3.10A) to 7 h (Fig. 3.10A). Very few (<5%) untreated cells or cells treated with bortezomib for 4–7 h did express p21, however, which might either reflect a stressed state or normal cell cycle arrest in these cells. However, when bortezomib treatment was extended to 10 h, p21 was highly expressed and accumulated in the nucleus, concomitantly with SG disassembly (Fig. 3.5D; bottom panel; see also Fig. 3.10A). To ensure that the proteasome is still inhibited at the time when SGs are disassembled, we monitored the expression of a reporter GFP fused to a proteasome-targeting sequence (GFPu). In the absence of any proteasome inhibitors, the GFPu protein is constitutively degraded by the proteasome [57], [58]. Treatment of these GFPu-expressing cells with bortezomib prevented the degradation of GFPu protein, which accumulated. This accumulation of GFPu persists even after prolonged treatment with bortezomib for 10 h and beyond (Fig. 3.12A and data not shown), indicating that the activity of the proteasome was not recovered. Moreover, prolonged treatment (10 h and beyond) with bortezomib resulted also in the accumulation of proteasome substrates such as p27 [59]–[61] (Fig. 3.12B and

data not shown) and p53 [59]–[61] (data not shown). These results indicate that the disassembly of SG occurred without reactivation of the proteasome. Nuclear p21 has previously been shown to promote cell cycle arrest, mainly by interfering with cyclin E/cdk2 activity [62]. On the other hand, other studies have reported that nuclear p21 accumulation promotes the formation of cyclin D-cdk4 complexes in cancer cells, thus contributing to increased proliferation and reduced apoptosis in tumors [63]. Therefore, we investigated whether nuclear p21 accumulation which occurred concomitantly with SG disassembly (cf. 10 h following bortezomib treatment; Fig. 3.5D, 3.10A, and 3.10D) might reflect cell cycle arrest. Time course-FACS analysis of cell cycle progression shows that bortezomib treatment does not affect cell cycle (Fig. 3.5E). As a control for cell cycle arrest we used nocodazole [64], which as shown in Figure 3.5E, stops cellular progression at G2/M. p21 was also shown to inhibit apoptosis through inactivation of pro-apoptotic proteins such as apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and caspase-3 in the cytoplasm [40], [65], [66]. We found that protracted treatment with bortezomib (16 h) induces a significant accumulation of p21 in the cytoplasm (Fig. 3.10A; bottom-right panel; see also Fig. 3.10E), which may reflect a role of this protein in antagonizing bortezomib-mediated apoptosis (see below). Overall, the results thus far show that bortezomib-mediated p21 upregulation involves two steps: (i) the initial accumulation of p21 mRNA, which correlates with SG formation, and (ii) the secondary translation of p21 mRNA, which correlates with SG disassembly. This pattern of events suggests that SG might serve as foci for the accumulation of p21 mRNA in a translationally repressed form.

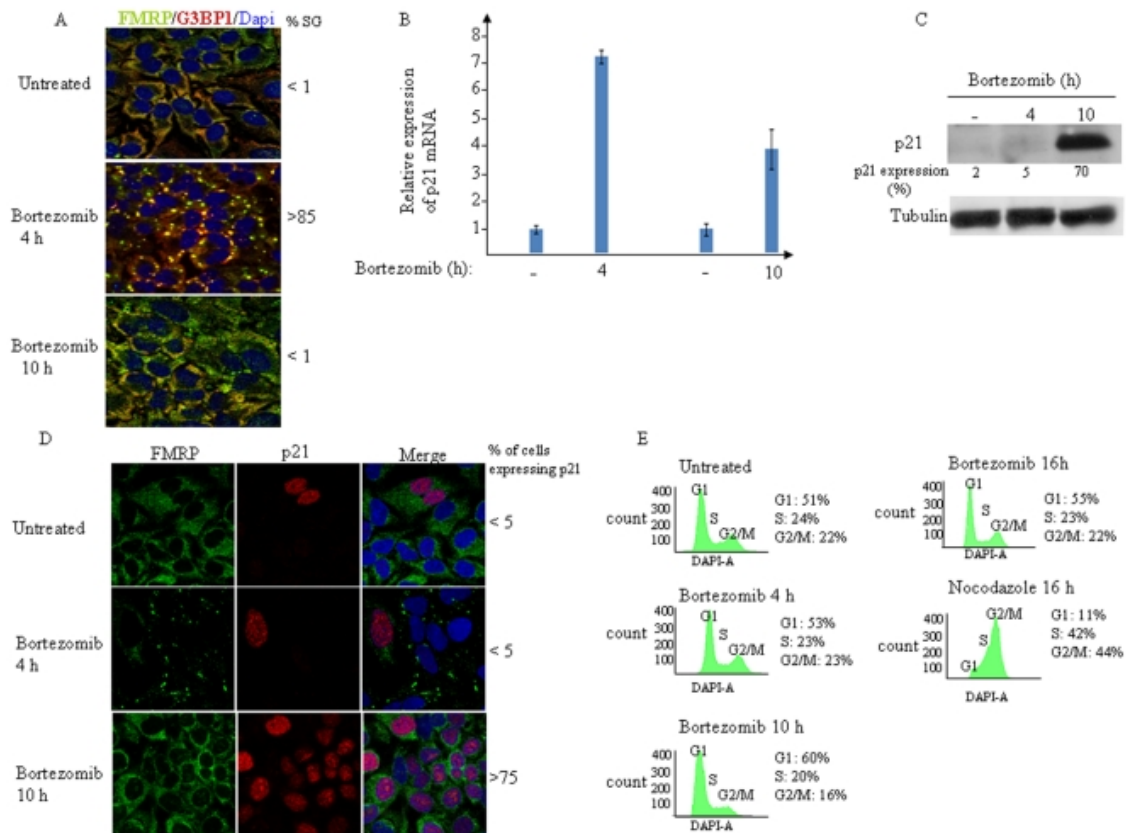


Figure 3-5 Bortezomib upregulates p21 mRNA expression.

(A) HeLa cells were treated with 2 μ M bortezomib for 4 h or 10 h, fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence using antibodies against different SG markers. DAPI is used as a nuclear stain. Pictures were taken using 63X objective. The percentage of cells harboring SG (>3 granules/cell) from five different fields and three different experiments containing a total of 1000 cells is indicated. (B) qRT-PCR of p21 mRNA. Following treatment with bortezomib for the indicated period, cells were collected and total RNA content was then isolated. The amount of p21 was quantified by real time-PCR relative to GAPDH mRNA using the $\Delta\Delta$ Ct method. Results are expressed as the mean \pm SEM (error bars) of triplicate measurements. (C) HeLa cells were treated with 2 μ M bortezomib for the indicated time, and the level of p21 was analyzed by western blotting using specific antibodies (*top* panel). Tubulin is used as a loading standard. The amount of p21 was determined by quantitation of the signals on films by densitometry using Adobe Photoshop software and expressed as a percentage relative to the amounts of tubulin. The results are representative of five different experiments. (D) HeLa cells were treated as in (A). p21 protein was detected using anti-p21 antibodies and SG were visualized with anti-FMRP antibodies. (E) Bortezomib does not affect cell cycle at the time points analyzed. Cells were treated with 2 μ M bortezomib or with 0.8 μ g/ml nocodazole for the indicated interval, collected, washed with PBS, and then fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min. Cells were washed with PBS, stained with DAPI (1 μ g/mL) and analyzed by flow cytometry.

Bortezomib treatment induces p21 mRNA segregation with SG and its stabilization

We next assessed whether accumulating p21 mRNA was localized in bortezomib-induced SG. For that purpose, we used fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to visualize p21 mRNA in fixed HeLa cells, using fragile X mental retardation protein (FMRP) [14], [67],[68] as a marker for staining SG (Fig. 3.6A). Resulting staining reflected a typical localization of FMRP in the cytoplasm in control experiments (Fig. 3.6A, panels 8 and 11), and in SG upon bortezomib treatment (Fig. 3.6A, panels 2 and 5). FISH showed a barely

detectable p21 mRNA staining in untreated cells (Fig. 3.6A, panel 7; see also Fig. 3.13A and 3.13C), in keeping with the low amount of p21 mRNA and protein observed under normal growth conditions (cf. Fig. 3.5B–C and 3.10C). Bortezomib induced the localization of p21 mRNA in SG in a high percentage (~80%) of cells, as assessed by FISH using the targeted (antisense) probe (Fig. 3.6A, panels 1 and 3; see also Fig. 3.13A–B). Quantification of the intensity of p21 mRNA FISH signal in SG compared to the cytoplasm revealed that the major fraction (~80%) of p21 mRNA was associated with SG (Fig. 3.6B; left panel; see also Fig. 3.13B). Background FISH signal was detected in SG and in the cytoplasm using the untargeted (sense) probe (Fig. 3.6A, panels 4 and 6, and Fig. 3.6B; center and right panels). Similar background signal was detected in the cytoplasm of bortezomib-treated cells using the antisense probe (Fig. 3.6A, panels 1 and 3; see also the right panel of Fig. 3.6B for quantification), as compared to the signal obtained using the sense probe (Fig. 3.6A, panels 4 and 6, and the right panel of Fig. 3.6B). The SG-linked FISH signal which is detected using antisense probe was specific to p21 mRNA since it was lost in cells treated with p21-targeted siRNA to deplete the transcript (Fig. 3.6C; compare panels 1 and 4, and Fig. 3.6D). p21 depletion itself did not affect SG formation, as suggested by the localization of several SG markers (Fig. 3.6C, and data not shown) ruling out the possibility that the loss of SG-linked FISH signal observed in p21-depleted cells was due to a general cellular failure to form SG. As expected, prolonged treatment (10 h) of cells with bortezomib induces SG disassembly and p21 mRNA localization to the cytoplasm and to the nucleus (Fig. 3.13A and 3.13C; bottom-left panels). At this time, however, the overall p21 mRNA FISH signal is weaker than the one observed in cells treated with bortezomib for 4 h (Fig. 3.13A; compare bottom-left with center-left panel), in keeping with the decreased amount of p21 mRNA as measured by qRT-PCR following SG disassembly (Fig. 3.5B). Overall, the results (Fig. 3.6A–B and 3.13A–B) show that p21 mRNA is quantitatively recruited to bortezomib-induced SG. We then assessed the possible contribution of p21 mRNA localization in SG in its accumulation. We have previously reported that the formation of bortezomib-induced SG requires heme-regulated inhibitor kinase (HRI) [14]. Thus, we examined whether altering SG formation via HRI depletion affects p21 mRNA accumulation. We found that HRI depletion indeed prevented p21 mRNA accumulation following bortezomib treatment, as assessed by qRT-PCR (Fig. 3.14A). HRI was efficiently depleted as assessed by western blotting (Fig. 3.14B), and as expected, its depletion completely prevented SG formation (Fig. 3.14C). Altogether, these results show that bortezomib treatment induces p21 mRNA accumulation in SG. We then addressed the hypothesis that this p21 mRNA accumulation reflects its stabilization. For this purpose, we determined the effect of bortezomib on p21 mRNA stability in the presence of actinomycin D. Upon inhibition of de novo RNA synthesis with actinomycin D, the relative half-life of p21 mRNA was increased from 60 min \pm 10 min in untreated cells to >3 h upon bortezomib treatment (Fig. 3.6E–F), reflecting bortezomib-induced accumulation of p21 mRNA (Fig. 3.5B). As shown in Figure 3.6E, however, the p21 mRNA decay included a plateau phase. This indicated that the p21 mRNA decay may not be a first order process. This type of decay

occurs if two or more degradation processes with different rate constants are involved. Subpopulation of p21 mRNAs may be restricted to discrete subcellular locations that prevent their decay. Also, the decay of some p21 mRNAs may be mediated by competing pathways and/or decay mechanisms utilizing distinct trans-acting complexes, which could then affect their decay rates. Nevertheless, our results suggest that p21 mRNA segregation in SG contributes to its stabilization and accumulation upon bortezomib treatment. Next we sought to determine which factor is involved in p21 mRNA localization in SG.

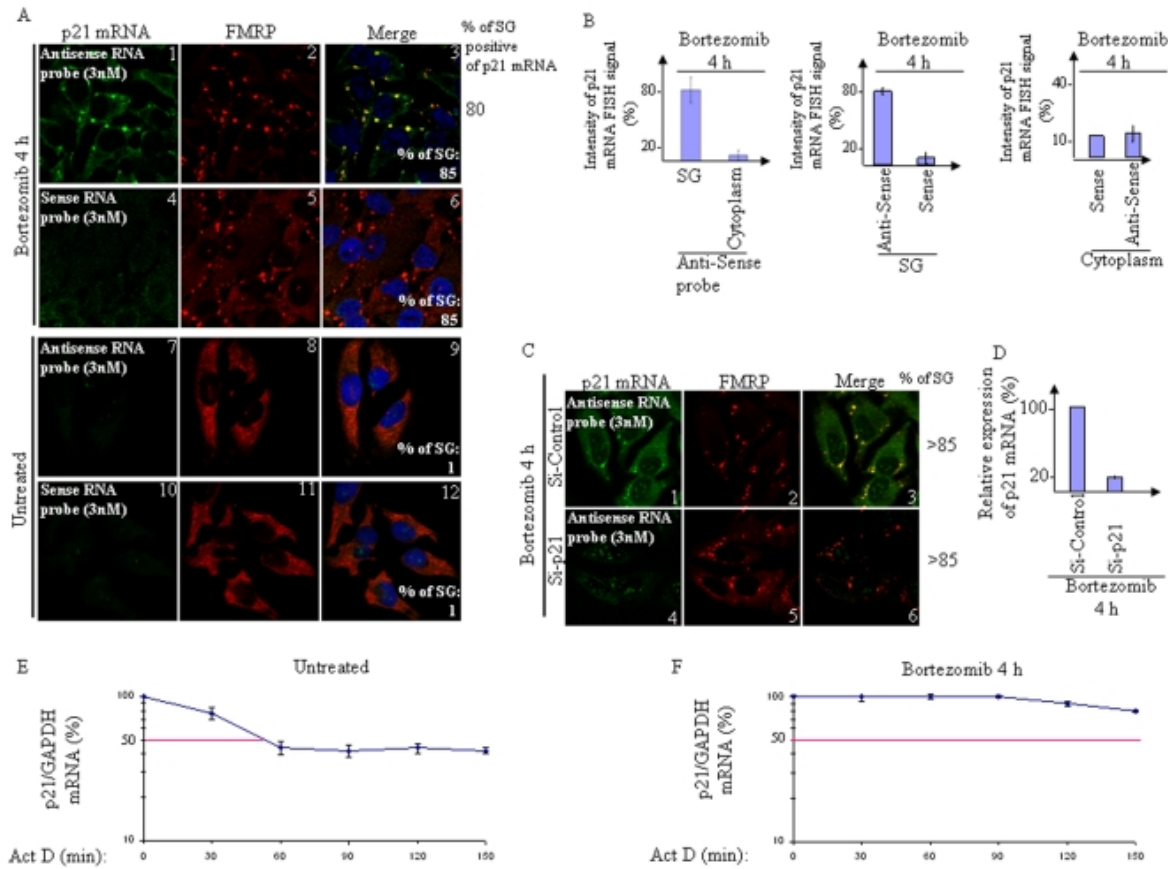


Figure 3-6 The accumulation of p21 mRNA following bortezomib treatment involves its stabilization and correlates with its segregation in SG.

(A–B) Bortezomib induces p21 mRNA segregation into SG. Following treatment with bortezomib (2 μ M) for 4 h, HeLa cells were fixed, permeabilized, and then incubated with 3 nM of an Alexa Fluor 488-labeled antisense RNA probe to detect p21 mRNA (panels 1–3 and 7–9) or with the Alexa Fluor 488-labeled sense probe as control (panels 4–6 and 10–12). SG were detected using anti-FMRP antibodies. The percentage of SG (>3 granules/cell) under each condition is indicated at the bottom of the right panels. The percentage of cells harboring SG positive for p21 mRNA is indicated at the right. Shown are typical results from five different fields and three different experiments containing a total of 1000 cells. (B) Densitometry quantification of FISH signal with Adobe Photoshop software. The number of pixels and mean intensities were recorded for the selected regions (SG, cytoplasm and background) using Photoshop. The mean intensity was multiplied by the number of pixels for the region selected in order to obtain the absolute intensity. The absolute intensity of the background region was subtracted from each region of interest. In order to compare the intensity between two given regions of interest, relative intensities were next calculated. Relative intensities correspond to the absolute intensities normalized according to the absolute intensity of the region of reference. (C–D) p21 mRNA FISH signal is lost upon p21 knockdown. Cells were treated with p21 or control siRNA. Seventy-two hours later, cells were treated with bortezomib (2 μ M for 4 h) in order to induce SG, and then processed for FISH to detect p21 mRNA coupled with immunofluorescence in order to visualize SG (C). In (D), cells were lysed and their RNA content analyzed for the expression levels of p21 mRNA using qRT-PCR. p21 mRNA levels were standardized against the non-target GAPDH mRNA and expressed as a percentage of the initial mRNA levels (i.e. at time zero) present at each time point. The error bars correspond to the SD of three independent experiments. (E–F) Bortezomib induces p21 mRNA stabilization. HeLa cells were left untreated (E) or were treated with bortezomib (2 μ M) for 4 h (F). Cells were then incubated with 5 μ g/ml actinomycin D for 30 minutes and collected at the indicated time points following the incubation. Total RNA was isolated and the level of p21 mRNA expression was determined by qRT-PCR, standardized against GAPDH mRNA, and expressed as a percentage of the initial mRNA levels (i.e. at time zero) present at each time point. The error bars correspond to the SD of three independent experiments.

Role of CUGBP1 in p21 mRNA accumulation and subsequent translation during bortezomib treatment

The SG components HuR and CUGBP1 have been shown to bind p21 mRNA, thereby regulating its expression [14], [54], [69]. While HuR promotes p21 mRNA stabilization through interaction with its AU-rich element in the 3'-untranslated region, CUGBP1 interacts with the GC-rich element in the 5' region of p21 mRNA coding sequence and promotes its translation in senescent fibroblast cells. We investigated the role of these two proteins in the upregulation of p21WAF/CIP1 observed upon proteasome inhibition in HeLa cells. We found that depletion of HuR had no effect or rather slightly increased p21 protein expression following bortezomib treatment (data not shown). Depletion of CUGBP1 using two specific siRNAs had no effect on p21 protein expression under normal growth conditions but prevented bortezomib-mediated p21WAF/CIP1 upregulation as assessed by western blot analysis using anti-p21 antibodies (Fig. 3.7A and data not shown). These results indicate that CUGBP1 promotes p21 upregulation upon proteasome inhibition. As a first step to investigate how CUGBP1 up-regulates p21 upon proteasome inhibition, we performed co-localization studies between CUGBP1 and p21 mRNA. Under normal growth conditions, CUGBP1 is mostly nuclear [32], [56] (Fig. 3.13C, panel 2). Arsenite induces the localization of a fraction of CUGBP1 in SG [32], [56], and our immunofluorescence experiments showed that CUGBP1 was also recruited into bortezomib-induced SG (Fig. 3.7B). Quantification of these immunofluorescence data show that a significant fraction (~45%) of total CUGBP1 is present in SG (Fig. 3.7B–C) where it co-localized with p21 mRNA (Fig. 3.7B and 3.7D–E) following treatment with bortezomib. Under these conditions, about 50% of CUGBP1 is nuclear (Fig. 3.7B–C) and only residual staining of CUGBP1 is detected in the cytoplasm (Fig. 3.7B and 3.7D). Prolonged treatment with bortezomib (10 h) resulted however in nuclear localization of most CUGBP1 (Fig. 3.13C). At this time we detected also some p21 mRNA FISH signal in the nucleus. However, and as mentioned above, the overall p21 mRNA FISH signal at 10-h bortezomib treatment is reduced (Fig. 3.13A and 3.13C), as compared to 4 h treatment (Fig. 3.13A; see also Fig. 3.6A) at which time point most of p21 mRNA (~80%) co-localized with CUGBP1 in SG (Fig. 3.7B and 3.7D–E). Overall, our results (Fig. 3.7B) indicate that bortezomib treatment induces CUGBP1-p21 mRNA co-localization in SG. CUGBP1 might thus bind to p21 mRNA and recruit it to SG where it accumulates. The latter assumption would therefore predict that CUGBP1 depletion should trigger p21 mRNA degradation, which would explain the low amount of p21 protein following prolonged proteasome inhibition in CUGBP1-depleted cells (Fig. 3.7A). Indeed, we first confirmed that CUGBP1 binds to p21 mRNA under bortezomib conditions, as assessed by immunoprecipitating CUGBP1 (Fig. 3.7F) followed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) to detect associated p21 mRNA (Fig. 3.7G). This binding was specific, as suggested by the finding that control p27 mRNA was not recovered in CUGBP1 immunoprecipitates (Fig. 3.7G). Second, the steady-state p21 mRNA level significantly decreased in CUGBP1-depleted cells following proteasome inhibition (Fig. 3.7H). Depletion of CUGBP1 had however no

effect on the steady-state level of p21 mRNA in untreated cells (Fig. 3.15A), suggesting that CUGBP1 is not required to maintain the basal level of the p21 mRNA. We then tested the possibility that the decreased level of p21 mRNA in CUGBP1-depleted cells upon bortezomib treatment might be consistent with a more rapid degradation of p21 mRNA. Indeed, the half-life of p21 mRNA in bortezomib conditions decreased from >3 h in mock-depleted cells (Fig. 3.8A) to 90 min \pm 15 min in CUGBP1-depleted cells (Fig. 3.8B). Depletion of CUGBP1 was efficient, as evidenced by both western blot analysis (Fig. 3.8C) and immunofluorescence (Fig. 3.8D), using anti-CUGBP1 antibodies. However, quantification of the localization of several SG markers (Fig. 3.8D, and data not shown) indicated that CUGBP1 depletion per se did not affect SG formation. This result ruled out the possibility that the destabilization of p21 mRNA observed in CUGBP1-depleted cells upon bortezomib treatment (Fig. 3.8A–B) was due to a cellular failure to form SG. One likely possibility of the destabilisation of p21 mRNA observed in CUGBP1-depleted cells is because it is no longer recruited to SG. We then assessed if CUGBP1 depletion affects the accumulation of p21 mRNA in SG using FISH. SG were visualized by immunofluorescence using antibodies to either Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 G3BP1 (Fig. 3.8D) or FXR1 (data not shown). Whereas the major fraction of p21 mRNA (~70%) is present in SG in over 60% of mock-depleted cells upon treatment with bortezomib (Fig. 3.8D–E), less than 30% of CUGBP1-depleted cells only exhibited such p21 mRNA localization in SG (Fig. 3.8D). Indeed, the large fraction of CUGBP1-depleted cells (~80%) has a barely detectable FISH p21 mRNA signal in SG and in the cytoplasm (Fig. 3.8D and 3.8F). Under those bortezomib conditions, quantification of the intensity of p21 mRNA FISH signal showed that CUGBP1 depletion decreased this signal to 30–40%, as compared to mock-depleted cells where most p21 mRNA FISH signal was detected in SG (Fig. 3.8G). This effect seems to be specific since under the same conditions, depletion of CUGBP1 does not affect the association of the non-target GAPDH mRNA [47] with SG as assessed by immunofluorescence coupled with FISH (Fig. 3.16). Overall, our results show that CUGBP1 depletion significantly prevented bortezomib-induced p21 mRNA accumulation, which is likely due to its mistargeting in SG. As aforementioned, CUGBP1 depletion does not affect p21 mRNA steady-state levels in normal growth conditions (Fig. 3.15A) and we found that this is also the case under staurosporine treatment (Fig. 3.15B), a SG-free apoptotic condition [70] (Fig. 3.15D). These results suggest that CUGBP1 is not required to maintain the steady-state levels of p21 mRNA in the cytoplasm. On contrary, CUGBP1 seems to be required for bortezomib-induced p21 mRNA accumulation in SG (Fig. 3.7H, 3.8D and 3.15C). We suggest that CUGBP1 promotes p21 mRNA accumulation by recruiting the transcript in SG, although we do not exclude that CUGBP1-mediated p21 mRNA accumulation involves additional mechanisms. Nevertheless, these results showed that CUGBP1 acts as a positive effector of p21 upregulation upon proteasome inhibition.

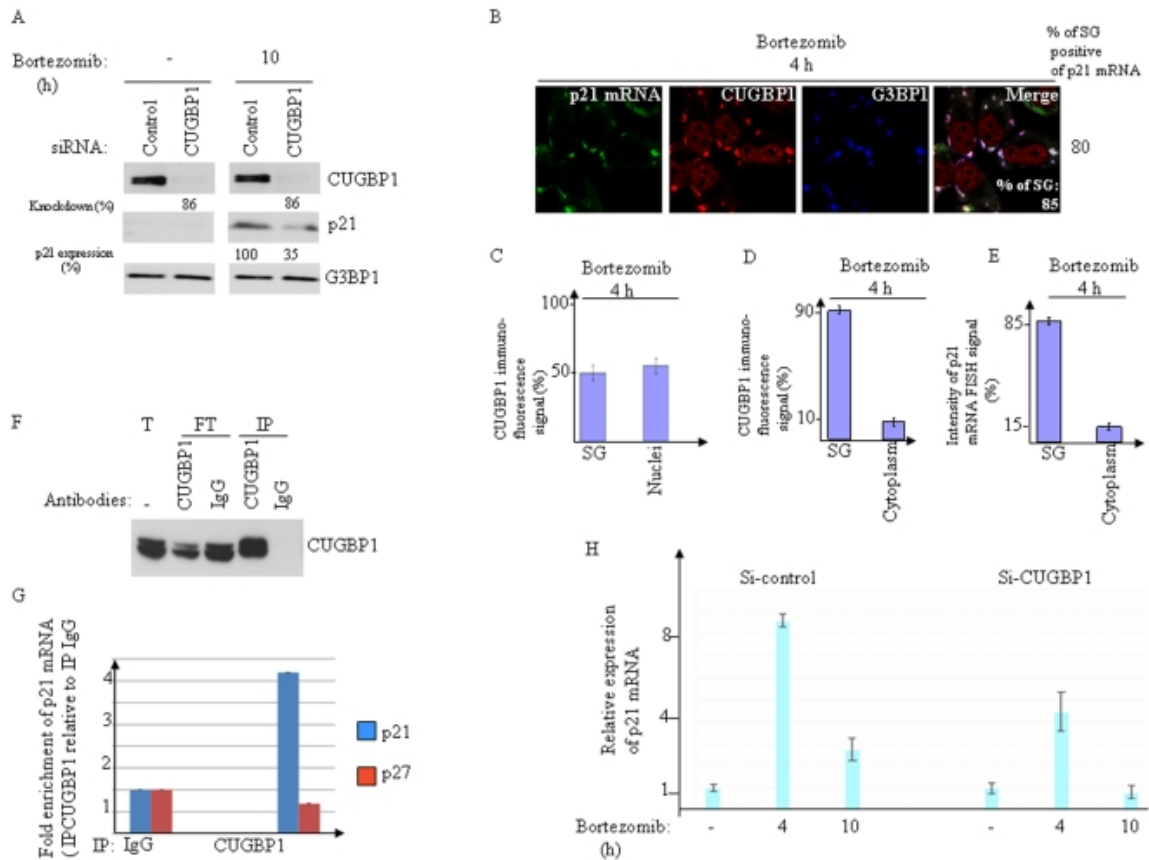


Figure 3-7 CUGBP1 binds to p21 mRNA and promotes its accumulation and expression upon bortezomib treatment.

(A–D) Seventy-two hours following transfection with CUGBP1, or control siRNAs, HeLa cells were treated with bortezomib (2 μ M) for either 10 h (A) or 4 h (B). (A) Protein extracts were prepared and analyzed by western blot to detect CUGBP1, p21, and G3BP1 proteins (loading standards) using the appropriate antibodies. The percentages of CUGBP1 knockdown and p21 expression were determined by quantitation of the signal on films by densitometry using Adobe Photoshop as described in Figure 3.5C. Shown are typical results of three experiments. (B–D) p21 mRNA is quantitatively recruited into SG where it co-localizes with CUGBP1. (B) Cells were processed for FISH to detect p21 mRNA coupled to immunofluorescence to visualize SG using antibodies against CUGBP1 and G3BP1. The percentage of SG (>3 granules/cell) is indicated at the bottom of the right panel. The percentage of cells harboring SG positives for p21 mRNA is also indicated on the right of the figure. Shown are typical results from five different fields and three different experiments containing a total of more than 1000 cells. (C–D) Densitometry quantification of CUGBP1 immunofluorescence signal in SG versus nuclei (C) and in SG versus the cytoplasm (D) using Adobe Photoshop software as described in Figure 3.5. (E) Densitometry quantification of p21 mRNA FISH signal was done as described in Figure 3.6. (F–G) HeLa cells were treated with bortezomib for 4 h and their extracts were used to immunoprecipitate CUGBP1 with anti-CUGBP1 antibodies and with IgG as a control. IP: Immunoprecipitate; FT: flow-through following immunoprecipitation; Total: the input used for immunoprecipitation. (F) Proteins were analyzed by western blot for CUGBP1 immunoprecipitation. (G) mRNAs were isolated from each immunoprecipitate and quantified by qRT-PCR. The amounts of p21 mRNA and p27 mRNA (as control) were normalized against GAPDH mRNA. (H) HeLa cells were treated with CUGBP1-specific siRNA, or with control (non-specific) siRNA as described above, incubated with 2 μ M bortezomib for either 4 or 10 h, lysed, and their total RNA isolated and analyzed for p21 mRNA levels by qRT-PCR. The amount of p21 mRNA was normalized against that of GAPDH mRNA as described in Figure 3.6.

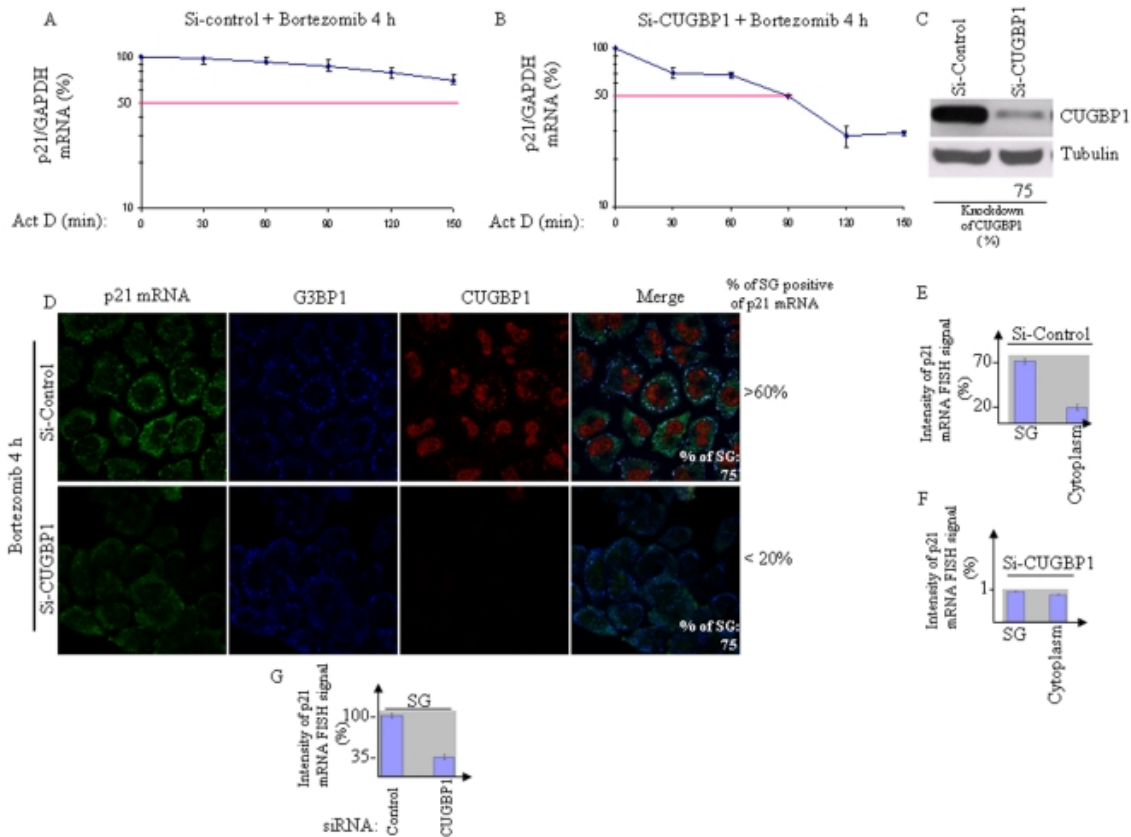


Figure 3-8 Reducing CUGBP1 levels prevents bortezomib-mediated p21 mRNA stabilization and accumulation in SG.

(A–B) HeLa cells were treated with non-specific (A), or with CUGBP1-directed siRNA (B), incubated with bortezomib (2 μ M) for 4 h, and actinomycin D (5 μ g/ml) was then added for a period of 30 minutes. Cells were collected at the indicated time points following the incubation and total RNA was isolated. The level of p21 mRNA expression was measured by qRT-PCR, standardized against GAPDH mRNA, and expressed as a percentage of the initial mRNA levels (i.e. at time zero) present at each time point. The error bars correspond to the SD of three independent experiments. (C) Depletion of CUGBP1 was assessed by western blot using anti-CUGBP1 antibodies and quantified as described in Figure 3.7. (D) HeLa cells were treated with CUGBP1-specific siRNA, or with control siRNA as described above, treated with bortezomib (2 μ M) for 4 h, and then fixed, permeabilized, and incubated with 3 nM of an Alexa Fluor 488-labeled antisense RNA probe to detect p21 mRNA. SG were detected using anti-G3BP1 antibodies. Depletion of CUGBP1 was assessed by immunofluorescence using anti-CUGBP1 antibodies. The percentage of SG is indicated at the bottom of the right panels. The percentage of cells harboring SG positives for p21 mRNA is also indicated. Those percentages are representative of typical results from three different experiments counting more than 1000 cells. (E–F) Densitometry quantification of p21 mRNA FISH signal in SG versus the cytoplasm in mock-depleted cells (E) and CUGBP1-depleted cells (F) as described in Figure 3.5. (G) Densitometry quantification of p21 mRNA FISH signal in SG in mock-depleted versus CUGBP1-depleted cells as described in Figure 3.6.

p21 upregulation prevents bortezomib-mediated cell death

Having revealed CUGBP1-mediated p21 mRNA accumulation as a pathway that promotes p21 upregulation following bortezomib treatment, we then investigated whether targeting this pathway might induce apoptosis. We have previously shown that suppressing SG formation induces massive apoptosis following bortezomib treatment [14]. We thus tested the effect of a decreased p21^{WAF1/CIP1} expression on apoptosis upon bortezomib treatment. HeLa cells treated with p21-specific or control siRNAs were exposed to bortezomib (2 μ M) for 16 h,

and apoptosis was then measured (i) by western blot analysis of the cleavage of caspase-3, one of the main effectors of caspase-dependent apoptosis, as well as (ii) with the percentage of annexin V-positive cells detected using flow cytometry. Depletion of p21^{WAF1/CIP1} was assessed by western blot (Fig. 3.9A) and did not induce significant apoptosis per se (Fig. 3.9A–B). Following a 16-h incubation with bortezomib, however, p21^{WAF1/CIP1} depletion resulted in significant (30%) caspase-3 cleavage (Fig. 3.9A), while promoting apoptosis in a high percentage (55%) of cells (Fig. 3.9B). Similar results were obtained using a different p21-specific siRNA (data not shown). Moreover, this effect was not specific to HeLa cells since p21^{WAF1/CIP1} depletion promoted bortezomib-induced apoptosis in Calu-I carcinoma cells (data not shown). Taken together, the present results thus strongly indicate that p21 upregulation can promote cancer cell resistance to bortezomib.

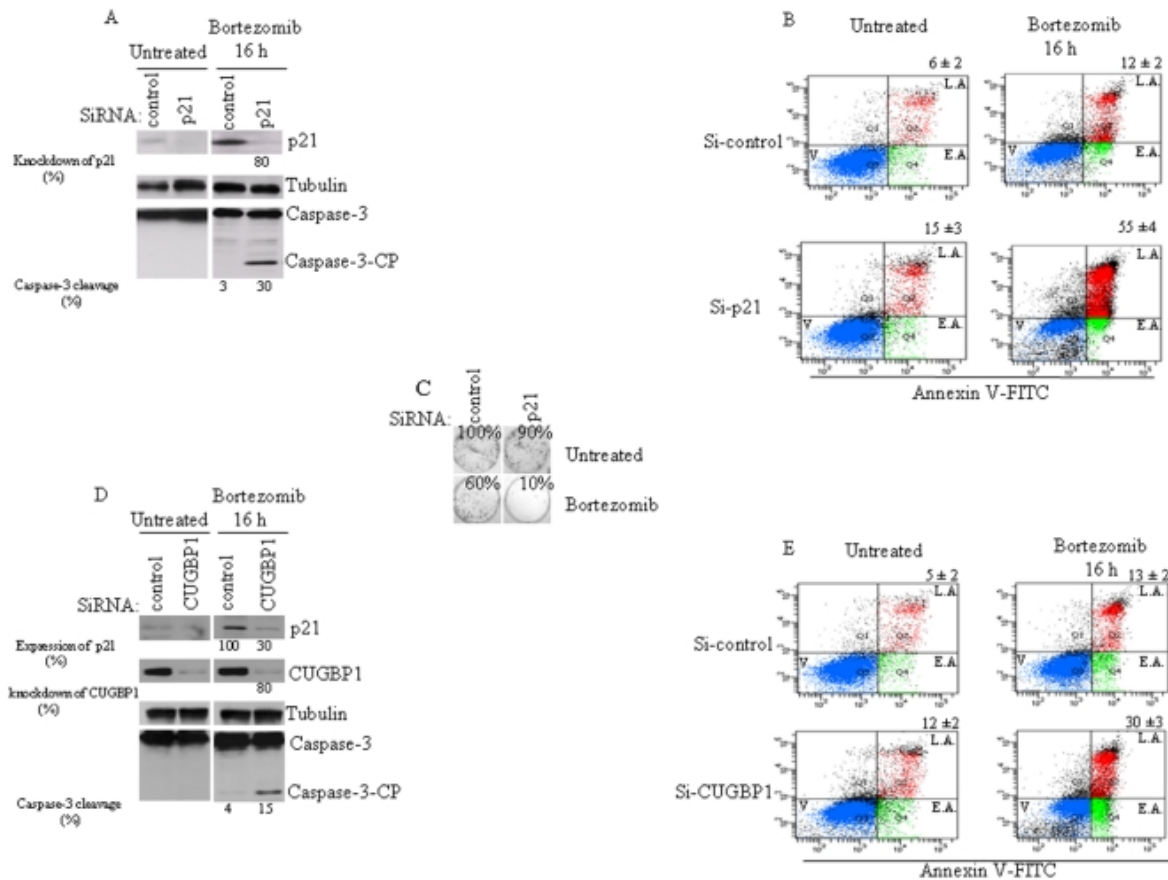


Figure 3-9 p21 depletion promotes bortezomib-mediated apoptosis.

(A) HeLa cells were transfected with p21-directed siRNA, or with a control siRNA. Forty-eight hours later, cells were collected and their protein extracts analyzed by western blot for the amount of p21 (*top panel*) using anti-p21 antibodies. The activation of caspase-3 was analyzed using anti-caspase-3 antibodies (*bottom panel*). CP: cleaved product. Tubulin is used as a loading standard (*middle panel*). The amount of p21 was determined by quantitation of the signals on films by densitometry using Adobe Photoshop software and expressed as a percentage relative to the amounts of tubulin. The percentage of caspase-3 cleavage was calculated by quantifying the signal of the caspase-3 cleaved product relative to the amount of total caspase-3. Shown are representative results of three different experiments. (B) Following treatment with p21-specific siRNA or with a non-specific siRNA, HeLa cells were incubated with bortezomib for 16 h, then stained with annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. The percentage of total dead or dying cells (indicated at the *top* of each panel) was defined as the sum of early (*lower right box*) and late (*upper right box*) apoptosis and corresponds to the mean \pm SEM from three independent experiments. V: viable cells; E.A: early apoptosis; L.A: late apoptosis. (C) Clonogenic assays. Following treatment with p21-specific siRNA or with a non-targeted siRNA, HeLa cells were incubated with bortezomib for 16 h, trypsinized, counted, replated in the absence of drug, and incubated for 10 d. Prior to counting colonies, cells were fixed, and then dried. Populations >50 cells were counted as one surviving colony. Data were calculated as the percentage of surviving colonies relative to the number found in control (untreated) plates. Results are expressed as the mean of triplicate measurements. (D–E) Reducing CUGBP1 levels promotes bortezomib-induced apoptosis. HeLa cells were treated with CUGBP1-specific siRNA, or with control siRNA. Seventy-two hours later, cells were either collected and their protein extracts analyzed by immunoblotting for the amount of p21, CUGBP1, tubulin (loading standard), and for caspase-3 activation, using corresponding antibodies (D), or stained with annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry (E) as described above. In D, the relative expression of p21 and CUGBP1 was determined as described in Figure 3.7, and the percentage of caspase-3 cleavage was quantified as described in (A). Shown are typical results of three different experiments. In (C), the percentage of total dead or dying cells is indicated at the top of each panel in E and is defined as the sum of early (*lower right box*) and late (*upper right box*) apoptosis and represents the means \pm s.e.m. from two independent experiments.

To further confirm the role of p21 in promoting resistance to bortezomib treatment, we performed clonogenic survival assays. HeLa cells were treated with p21-specific or control siRNAs, and following incubation with bortezomib, were washed to remove the drug, diluted and replated in fresh medium for 10 d, at which point colonies were counted. The results clearly showed that depleting p21^{WAF1/CIP1} significantly (40%) decreased cell survival and proliferation following treatment with bortezomib (Fig. 3.9C). Overall, the present data suggest that resistance of cancer cells to bortezomib-induced apoptosis involves p21^{WAF1/CIP1} upregulation.

Depletion of CUGBP1 sensitizes HeLa cells to bortezomib-induced apoptosis

The role of CUGBP1 in cancer cell resistance to apoptosis has not been previously investigated. From the above-described results (Fig. 3.7-3.9), we hypothesized that CUGBP1 might promote resistance to bortezomib through p21 upregulation. In such a case, decreasing p21 expression via CUGBP1 depletion should promote apoptosis following bortezomib treatment. Thus, HeLa cells treated with CUGBP1-specific or control siRNAs were exposed to bortezomib (2 μ M) for 16 h, and apoptosis was then assessed by caspase-3 cleavage (Fig. 3.9D) and annexin V assays (Fig. 3.9E). CUGBP1 depletion was confirmed by western blot (Fig. 3.9D) and did not induce significant apoptosis *per se* (Fig. 3.9D–E). Under bortezomib conditions, depletion of CUGBP1 induced cleavage of about 15% of total caspase-3 (Fig. 3.9D), and resulted in a significant percentage (30%) of cells undergoing apoptosis (Fig. 3.9E).

3.2.6. Discussion

The present study clearly shows that bortezomib treatment of cancer cells upregulates p21^{WAF1/CIP1} expression, which confers cellular resistance to apoptosis. Bortezomib-mediated p21 upregulation involves p21 mRNA accumulation in SG and its stabilization through the SG component CUGBP1. Our results suggest the following two-step model for bortezomib-induced p21 upregulation. In the first step, p21 mRNA is quantitatively sequestered into SG in a CUGBP1-dependent fashion, thereby protecting the normally highly unstable p21 mRNA against degradation, and contributing to its accumulation. The second step involves SG disassembly, thus releasing the large pool of accumulated p21 mRNA which is now available for immediate translation. This creates a massive pulse of p21^{WAF1/CIP1} synthesis that helps preventing apoptosis despite proteasome inhibition by bortezomib. Our study therefore identified a potential survival pathway involving both CUGBP1 and p21 which could be therapeutically targeted to antagonize cancer cell resistance to bortezomib-mediated apoptosis.

Increasing evidence has implicated p21 as an anti-apoptotic factor that promotes cancer cell resistance to therapeutic agents. It has been shown that the treatment of cancer mesothelioma cells with chemotherapeutic drugs such as Irinotecan induces p21 expression and cellular senescence [71]. Depletion of p21 by specific

short hairpin RNAs in tumor cells *in vivo* prevents Irinotecan-induced cell senescence, promotes apoptosis, and enhances the survival of Irinotecan-treated xenografts in animal models. p21 expression reduced the survival of Irinotecan-treated animals xenografted with mesothelioma tumor cells, in keeping with a potential role of p21 in chemoresistance [71]. Likewise, doxorubicin-treated breast, lung, and colon carcinoma cells undergo cellular senescence *in vitro*, which is characterized by a constitutively active ATM/ATR-dependent DNA damage response and the induction of p21 [72]. Blocking the ATM kinase with specific inhibitors suppresses p21 expression and induces apoptosis, suggesting that p21 acts downstream of ATM to promote cancer chemoresistance. It will be interesting to assess the hypothesis that chemotherapeutic drugs such as Irinotecan and doxorubicin can induce p21 upregulation through mechanisms involving the CUGBP1-SG pathway described in this work. A recent study has shown that imatinib, a BCR-ABL inhibitor used for the therapy of chronic myeloid leukemia (CML), downregulates p21 expression at both mRNA and protein levels in sensitive CML cells, while resistant CML cells exhibit increased p21 expression [73]. Overexpression of p21 mediated by transient transfection confers resistance to imatinib, a finding consistent with the hypothesis that p21 upregulation might promote resistance to chemotherapy. Our study shows that suppressing the expression of endogenous p21 is sufficient to prevent resistance to bortezomib-induced apoptosis. Future studies will be conducted to investigate the possibility that imatinib might prevent the bortezomib-mediated upregulation of p21 expression, which would sensitize cancer cells to apoptosis induction by the proteasome inhibitor.

The mechanisms by which p21 antagonizes apoptosis are not yet clear. p21 can block apoptosis indirectly by arresting cell cycle after nuclear binding to cyclin E-CDK2 and cyclin A-CDK2 complexes, or by increasing proliferation by promoting the nuclear accumulation of cyclin D-CDK4. However, FACS analysis of cell cycle progression shows that bortezomib does not affect cell cycle in our *in vitro* cancer cell model, despite the initial nuclear accumulation of p21 which is observed upon 10 h of bortezomib treatment. This result makes unlikely the possibility that p21-mediated resistance to bortezomib is due to its ability to arrest cell cycle. Moreover, protracted treatment (16 h) with bortezomib induces a cytoplasmic localization of p21. Stress-mediated cytoplasmic translocation of p21 involves its phosphorylation by kinases such as PKA and Akt [74], [75]. Cytoplasmic p21 has been shown to interact with the apoptotic effector caspase-3, in a PKA-phosphorylation dependant manner [76], and leading to resistance to Fas-mediated cell death [77], [78]. Alternatively, Akt-phosphorylated p21 can inhibit cell death induced by TNF α and other stimuli by inactivating ASK1 in the cytoplasm [37], [40], [75]. This MAPK kinase kinase activates the Jun N-terminal protein kinase in response to various genotoxic agents including proteasome inhibitors, which results with apoptosis [79]–[81]. Our immunoprecipitation experiments revealed an interaction between p21 and ASK1 during bortezomib treatment (Unpublished results). Although speculative at this stage, we propose that p21 inhibits bortezomib-

mediated apoptosis by inactivating pro-apoptotic factors such as ASK1. Studies are underway to (i) determine the mechanisms underlying the cytoplasmic translocation of p21 and (ii) define if ASK1 is the target by which p21 prevents bortezomib-mediated apoptosis.

Our study also provides evidence that CUGBP1 might act as a potential factor in resistance to bortezomib-mediated apoptosis by promoting p21 mRNA stabilization/accumulation and expression. Previous studies have shown that CUGBP1 promotes p21 mRNA expression in normal cells by loading the transcript into translating ribosomes [54]. On contrary, other reports identified CUGBP1 as a factor that inhibits the expression of its target mRNAs by promoting their decay in the cytoplasm [47], [50], [52]. Our study identified a novel role of CUGBP1 in promoting p21 mRNA stabilization during proteasome inhibition, which could involve its recruitment to SG. First, qRT-PCR showed that bortezomib highly induces p21 mRNA stabilization leading to its accumulation. Second, FISH experiments revealed that the p21 mRNA thus accumulating is quantitatively recruited to bortezomib-induced SG. The possible contribution of SG in protecting p21 mRNA from turnover is supported by findings that bortezomib-induced p21 mRNA accumulation is lost in HRI-depleted cells, which do not form SG. Third, actinomycin D experiments show that CUGBP1 depletion prevents bortezomib-induced p21 mRNA stabilization. CUGBP1 depletion does not affect, however, SG formation. This excludes the possibility that p21 mRNA destabilization observed in CUGBP1-depleted cells upon bortezomib treatment is due to a failure to form SG. Quantification of FISH data show that CUGBP1 depletion significantly decreased the overall amount of p21 mRNA, as compared to mock-depleted cells where most of the accumulated p21 mRNA was detected in SG. These latter results further corroborate our qRT-PCR data showing that CUGBP1 is required for p21 mRNA accumulation upon bortezomib treatment. However, CUGBP1 depletion does not affect the steady-state levels of p21 mRNA under SG-free conditions tested, further supporting previous reports [47],[50], [52] which indicate that CUGBP1 may not act as a general stabilizing factor in the cytoplasm. We suggest that CUGBP1 promotes p21 mRNA stabilization upon bortezomib treatment indirectly by inducing its recruitment into SG. However, one cannot exclude the possibility that CUGBP1 is not essential for recruiting p21 mRNA to SG, but is required instead for sequestering p21 mRNA in these structures. In any case however, our results show that under bortezomib conditions, CUGBP1 is required for p21 mRNA segregation in SG thus promoting its stabilization. At this stage, the mechanism responsible for the stabilization of p21 mRNA in SG remains to be determined. In general, destabilization of the mRNA involves both removal of its 5'-end cap structure (or decapping) and deadenylation of its polyA tail, followed by exoribonuclease digestion from both ends. Proteins that protect either the cap structure or the polyA tail, such as eIF4E and PABP, respectively, have been identified as SG components [82], [83]. In contrast, enzymes that activate decapping or deadenylation, such as Dcp1a and PARN, respectively, are absent from SG [82], [84]. Thus, there is evidence that SG might protect p21 mRNA from degradation by isolating it from destabilizing factors, and

CUGBP1 might promote p21 mRNA stabilization and accumulation either by recruitment or sequestration into SG. As a decaying factor, CUGBP1 was shown to interact directly with the PARN deadenylase to facilitate the removal of the poly(A) tail and thereby destabilize its target mRNAs [48]. It is thus tempting to speculate that the sequestration of CUGBP1 in SG prevented its association with PARN, thus protecting the associated p21 mRNA from turnover in SG. The association of CUGBP1 with p21 mRNA is likely to be subject to regulation by phosphorylation via the action of cyclin D3-cdk4/6 [85]. Interestingly, the residue targeted for phosphorylation by cyclinD3-cdk4/6 (Ser302) lies within the linker region of CUGBP1[85], which has been shown to be required for localization in SG upon arsenite treatment [56]. Future investigations should determine if CUGBP1 phosphorylation at Ser302 is required for its localization in SG, as a prerequisite to p21 mRNA accumulation. Upon disassembly of SG, a large fraction of the p21 mRNA pool becomes available for rapid translation, thereby creating a transient pulse of high p21 expression. Previous studies have shown that CUGBP1 promotes p21 translation in senescent cells through binding to the GC-rich element in the 5' region of p21 mRNA and loading of the mRNA onto ribosomes [54]. Following SG disassembly, therefore, CUGBP1 might also enhance p21 mRNA translation by promoting its association with ribosomes, although this remains to be demonstrated in a future study. In addition to GC-rich element, p21 mRNA contains two other regulatory elements, namely a AU-rich element and a GU-rich sequence located in its 3'-untranslated region. It is unlikely that the GU-rich element plays a role in the upregulation of p21 mRNA during proteasome inhibition, since this sequence is known to promote mRNA destabilization [49]. In contrast, the AU-rich element of p21 mRNA has been shown to confer p21 mRNA stabilization through its association with the RNA-binding protein HuR [43], [86]–[88]. However, our results show that HuR is dispensable for p21 mRNA accumulation during bortezomib treatment, suggesting that the AU-rich element is unlikely to be involved in the mechanism leading to p21 mRNA stabilization under bortezomib treatment. Studies are in progress to identify the cis-acting elements of p21 mRNA that interact with CUGBP1 in promoting localization and accumulation of this mRNA in SG. In addition to p21 mRNA, CUGBP1 might also promote localization of other mRNAs encoding antiapoptotic proteins in SG, thus leading to their accumulation. Several mRNAs encompassing GC-rich sequences in their 5'-region encode survival factors involved in the malignant phenotype, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and survivin [89], which could be potential targets of CUGBP1. Future studies will determine the role of CUGBP1 in the regulation of anti-apoptotic factors such as VEGF and survivin during chemotherapy.

3.2.7. Conclusions

The present study has identified p21^{WAF1/CIP1} and its regulatory protein CUGBP1 as key players in the inhibition of apoptosis observed during treatment with bortezomib. Future studies should determine whether targeting these two factors might sensitize tumors to proteasome inhibitors in mouse models.

3.2.8. Materials and Methods

Cell Lines and Cultures

HeLa cervical cancer, Calu-1 lung cancer, and MCF-7 breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA; ATCC). Cells were cultured in DMEM (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma), penicillin, and streptomycin (Sigma). 293 cells stably transfected with green fluorescent protein ubiquitin (GFPu) were purchased from ATCC and handled as previously described [57], [58].

Drugs and Drug Treatments

Bortezomib was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA) and dissolved in DMSO as a 65 mM stock solution, aliquoted and stored at -20°C . Bortezomib treatment was performed when cells had reached 60–80% confluence. Staurosporine was purchased from Sigma.

Antibodies

Phospho-specific anti-eIF2 α and the pan anti-eIF2 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-HuR, anti-G3BP1, anti-FMRP, anti-FXR1, and anti-eIF4E were made in-house and have been previously described [14], [76]. Anti-CUGBP1, anti-p21, and anti-HRI antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). The anti-tubulin and anti-caspase-3 antibodies were obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA), and Cell Signaling (Danvers, MA), respectively. Anti-p27 and anti-GFP antibodies were purchased from BD Bioscience and Abcam, respectively.

Small-Interfering RNA (siRNA) Experiments

siRNA-p21 were purchased as validated siRNAs from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). siRNA-CUGBP1, siRNA-HuR, siRNA-HRI, and siRNA non-targeting control were obtained from Dharmacon (Lafayette, CO). siRNA transfections were performed essentially as described [14], [76], using Hiperfect reagent (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Twenty-four hours before transfection, cells were trypsinized and plated at a density allowing to reach 60–80% confluence after 24 h. For a 6-well plate, annealed duplexes were used at a final concentration of 5 nM. Seventy-two hours post-transfection, cells were either fixed and processed for immunofluorescence, or harvested for protein extraction.

siRNA-p21: 5' *AAGACCATGTGGACCTGTCAC* 3'

siRNA-CUGBP1: 5'-GAGCCGAGGTTGTGCATTT-3'

siRNA-HuR: 5'-GGGATAAAGTAGCAGGACA-3'

si-HRI: 5'-GATCTGAAGTGGAAGCTAA-3'

Immunofluorescence and RNA FISH

Following fixation and permeabilization (20 minutes in 3.7% paraformaldehyde at room temperature followed by a 15-min immersion in MeOH at -20°C), fixed cells were incubated with primary antibodies diluted in 0.1% Tween-20/PBS (PBST) for 2 h at room temperature. After washing with PBST, cells were incubated with goat anti-mouse/rabbit IgG (H+L) secondary antibodies conjugated with the Alexa Fluor dye with the appropriate absorption maximum (405/488/594) for 1 h, washed, and then mounted.

For FISH experiments, a DNA fragment encompassing the p21 coding region was amplified by PCR using primers fused either with T3 (p21-forward: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGATGTCCGTCAGAACCCATGC-3') or T7 (p21-reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTAGGGCTTCTCTTGGAGA-3') minimal promoter sequences. The DNA fragment encompassing the GAPDH coding region was amplified by PCR using primers fused either to the T3 (GAPDH-forward: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGAAACTGTGGCGTGATG-3') or T7 (GAPDH-reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACTCCTTGGAGGCCATG-3') minimal promoter sequences. The amplified fragments were used as templates for *in vitro* transcription to produce either a p21 or GAPDH antisense RNAs from the T7 promoter, or p21 and GAPDH sense RNAs from the T3 promoter, using the FISH Tag RNA Green Kit with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). In the latter technique, *in vitro* transcription incorporates an amine-modified UTP into the probe template. The purified RNA is then incubated with an amine-reactive Alexa Fluor 488 dye (e.g. the succinimidyl ester of Alexa Fluor 488 carboxylic acid) which binds and reacts with the modified UTP. The conjugated probe is then purified, quantified, denatured, and incubated with cells. Before hybridization, cells were fixed and permeabilized as described above, and then prehybridized in 50% PBST/50% hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 1 mM phosphate buffer, pH 7.4, 1X Denhardt's solution, and 160 ng/ μl of denatured salmon sperm DNA) at room temperature for 10 min with gentle rocking. After two washes with fresh hybridization buffer for 30 min at 42°C , the probe was added to the hybridization buffer and incubated with the cells for 16 h at 42°C . After hybridization, cells were processed for immunofluorescence as described above. Probes were visualized using the LSM 700 laser scanning confocal Axio Observer. Z1 microscope (Zeiss), equipped with a software ZEN 2009 for image acquisition and analysis. Images were acquired through the following settings: 63X oil objective (zoom 1.0), 0.06 μm for pixel size, and 1.00 airy units (AU) as Pinhole.

Immunoprecipitation, Quantitative RT-PCR and Actinomycin D Experiments

For immunoprecipitation, cells were collected and lysed at 4°C with a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.5% NP-40; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0.25 mM phenylmethanesulfonylfluoride; 0.5 mM DTT) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada) and 40 U/μl RNase Inhibitor (Invitrogen). The extract was then incubated with protein A Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare Life Sciences, Baie-d'Urfé, QC, Canada) conjugated with the appropriate antibody. Following three washes with lysis buffer, the beads were resuspended with an equal volume of washing buffer. Five percent of the suspension was used for immunoblot analysis of the immunoprecipitated proteins, and the remainder was used for RNA isolation. Briefly, following digestion with proteinase K, RNA was extracted with phenol/CHCl₃ and precipitated with isopropanol in the presence of glycogen. RNA was resuspended in water and analyzed by qRT-PCR.

RT-PCR reactions were performed using the Quantitect Reverse Transcriptase kit (Qiagen). Each reaction contained 2 μl of RNA (isolated using the RNeasy Plus Mini Kit; Qiagen) at 100 ng/μl, 10 μl of RNase-free water, 2 μl of genomic DNA Wipeout Buffer 7X, 4 μl of Quantiscript RT Buffer 5X, 1 μl of RT Primer Mix and 1 μl of Quantiscript Reverse Transcriptase.

Real-time PCR reactions were prepared using the Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada) in a total volume of 25 μl: 12.5 μl of PCR Master Mix, 0.67 μl of forward primer at 3.75 μM, 0.67 μl of reverse primer at 3.75 μM, 9.2 μl of deionized (Milli-Q grade) water and 2 μl of RT-PCR. Reactions were run and data then analyzed using the MX3000 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with a 4-stage program: (1) 2 min at 50°C, (2) 10 min at 95°C, (3) 40 cycles of a 2-step reaction: 95°C ×15 s and 55°C ×60 s, and (4) a 3-step reaction: 95°C ×15 s, 60°C ×20 s and 95°C ×15 s.

To prepare templates for the p21 mRNA, the oligonucleotide pair used was: 5'-GACTTTGTCACCGAGACACC-3' (forward), and 5'-GACAGGTCCACATGGTCTTC-3' (reverse). For preparing templates corresponding to the p27 mRNA, the oligonucleotide pair used was: 5'-AAGAGTTAACCCGGGACTTG-3' (forward), and 5'-CCACTCGTACTTGCCCTCTA-3' (reverse). For preparing templates corresponding to the GAPDH mRNA, the oligonucleotide pair used was: 5'-ACGACCACTTTGTCAAGCTC-3' (forward), and 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' (reverse).

For actinomycin D experiments, transcription was blocked using 5 μg/mL actinomycin D. RNA was isolated and analyzed as described above.

Annexin V-Fluorescein Isothiocyanate/Propidium Iodide Assay and FACS Analysis

At the end of the experimental treatment, both adherent and detached cells were harvested. Cells were washed with ice-cold PBS, then pelleted again at 1500 rpm for 10 min at 4°C, and resuspended in ice-cold binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Cells were subsequently stained with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) for 15 min in the dark. A total of 5×10⁴ cells were counted, and dead cells were examined by flow cytometry. For FACS analysis, collected cells were fixed with 3% paraformaldehyde, washed with PBS, and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 µg/mL) and analyzed by flow cytometry.

Clonogenic Survival Assay

Cells were plated in duplicate and incubated for 24 h. Following treatment, cells were washed with PBS, trypsinized, counted, replated in 6-well plates at 10³ cells/well in the absence of drug, and incubated for 10 d. Before colony counting, cells were washed with PBS, stained (0.1% (w/v) crystal violet in a 0.0037% (v/v) formaldehyde solution in PBS), rinsed with deionized H₂O, and dried. Populations >50 cells were counted as one surviving colony.

3.2.9. Supporting Information

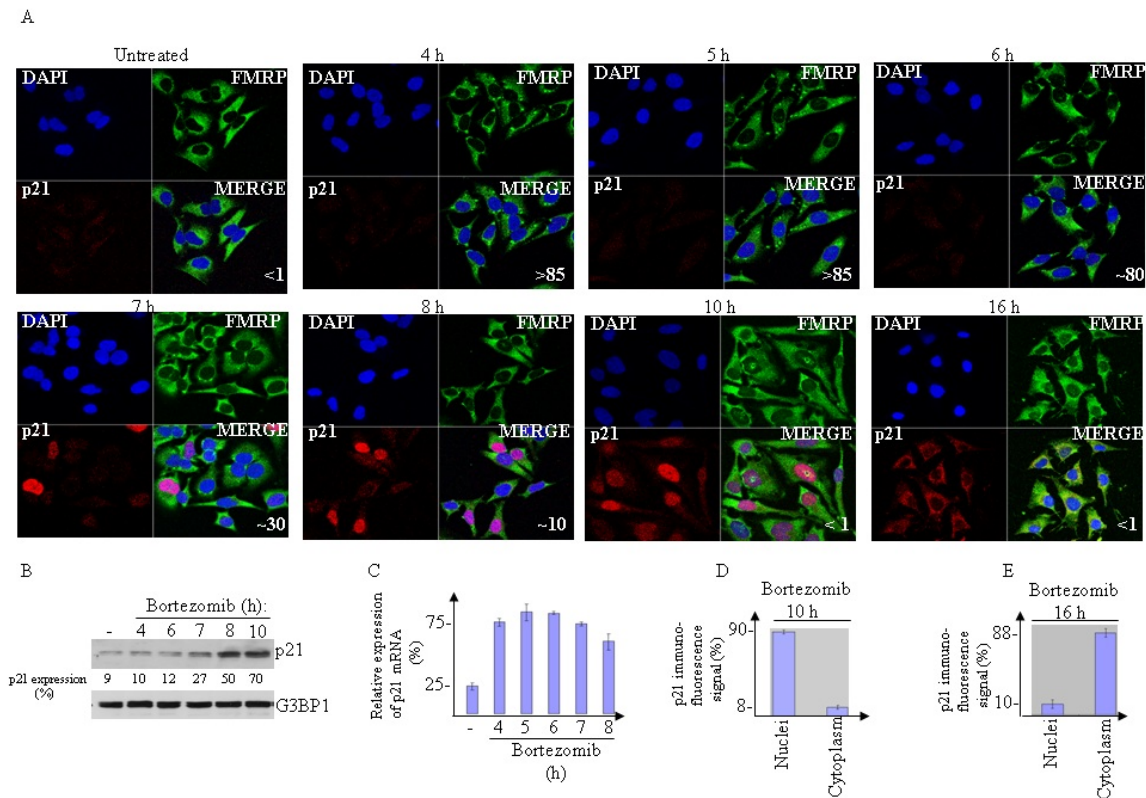


Figure 3-10 Time course analysis of SG formation and p21 expression during bortezomib treatment.

(A) HeLa cells were treated with 2 μ M bortezomib for the indicated period and then processed for immunofluorescence. SG were visualized with anti-FMRP antibodies and p21 protein was detected using anti-p21 antibodies. The percentage of cells harboring SG from five different fields and three different experiments containing a total of 1000 cells is indicated on the bottom of each merge picture. (B) HeLa cells were treated with 2 μ M bortezomib for the indicated period then collected for western blot analysis. Proteins were extracted and analyzed for the expression of p21 and as a loading control G3BP1, using the corresponding antibodies. The amount of p21 was determined by quantitation of the signals on films by densitometry using Adobe Photoshop software and expressed as percentage relative to the amounts of G3BP1. (C) qRT-PCR of p21 mRNA. Following treatment with 2 μ M bortezomib for the indicated period, cells were collected and total RNA content was then isolated. The amount of p21 was quantified by real time-PCR relative to GAPDH mRNA using the $\Delta\Delta$ Ct method. Results are expressed as the mean \pm SEM (error bars) of triplicate measurements. (D-E) Quantification of p21 immunofluorescence signal in nuclei versus the cytoplasm of cells treated with bortezomib for either, 10 h (D) or 16 h (E), using Adobe Photoshop software.

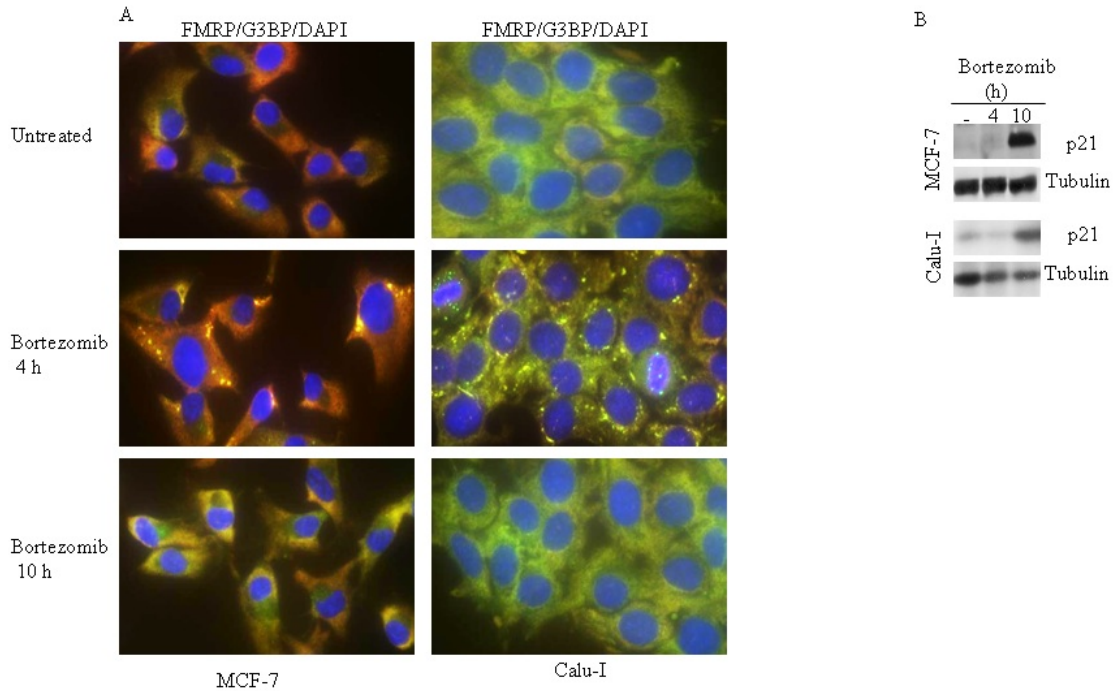


Figure 3-11 Bortezomib upregulates p21 mRNA expression in different cancer cells.

(A-B) Calu-I and MCF-7 cells were treated with bortezomib and processed for immunofluorescence (A), or lysed, and their protein extracts were analyzed for the levels of p21 and tubulin (B), as described in the legend to Figure 3.5.

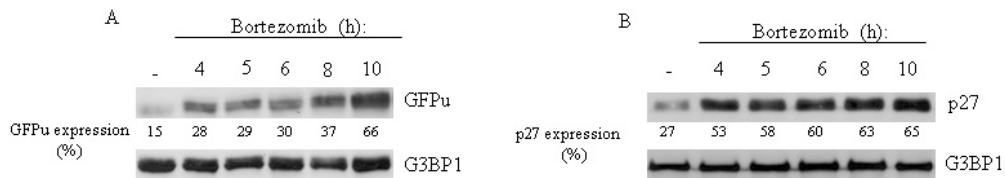


Figure 3-12 Expression profile of proteasome substrates during bortezomib treatment.

GFPu-expressing 293 cells (A) and HeLa (B) were treated with 2 μ M bortezomib for the indicated time. Proteins were extracted and analyzed for the expression of GFPu (A) and p27 (B), using the corresponding antibodies. G3BP1 was used as a loading control. The amounts of GFPu and p27 were determined by quantitation of the signals on films by densitometry using Adobe Photoshop software and expressed as a percentage relative to the amounts of G3BP1.

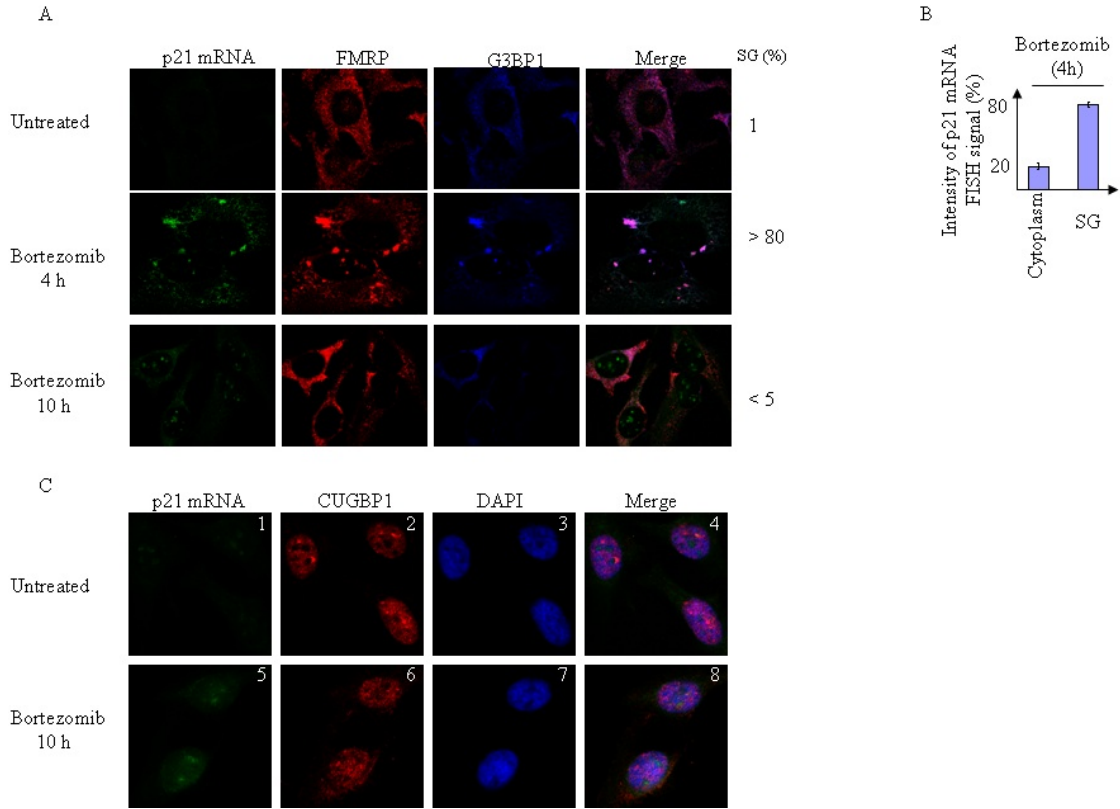


Figure 3-13 Prolonged treatment with bortezomib induces a redistribution of the p21 mRNA in the cytoplasm and nuclei.

(A-B) HeLa cells were treated with 2 μ M bortezomib for the indicated periods. SG were visualized with anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies, and p21 mRNA was detected by FISH. The percentage of SG is indicated. The percentage of cells harboring SG positive for p21 mRNA is also indicated. Shown are typical results from five different fields and three different experiments containing a total of more than 1000 cells. (B) Densitometry quantification of p21 mRNA FISH signal in SG versus the cytoplasm was done with Adobe Photoshop software as described in Figure 3.6B. (C) HeLa cells were treated with 2 μ M bortezomib for 10 h. SG were visualized with anti-CUGBP1 antibodies. DAPI depicts nuclei.

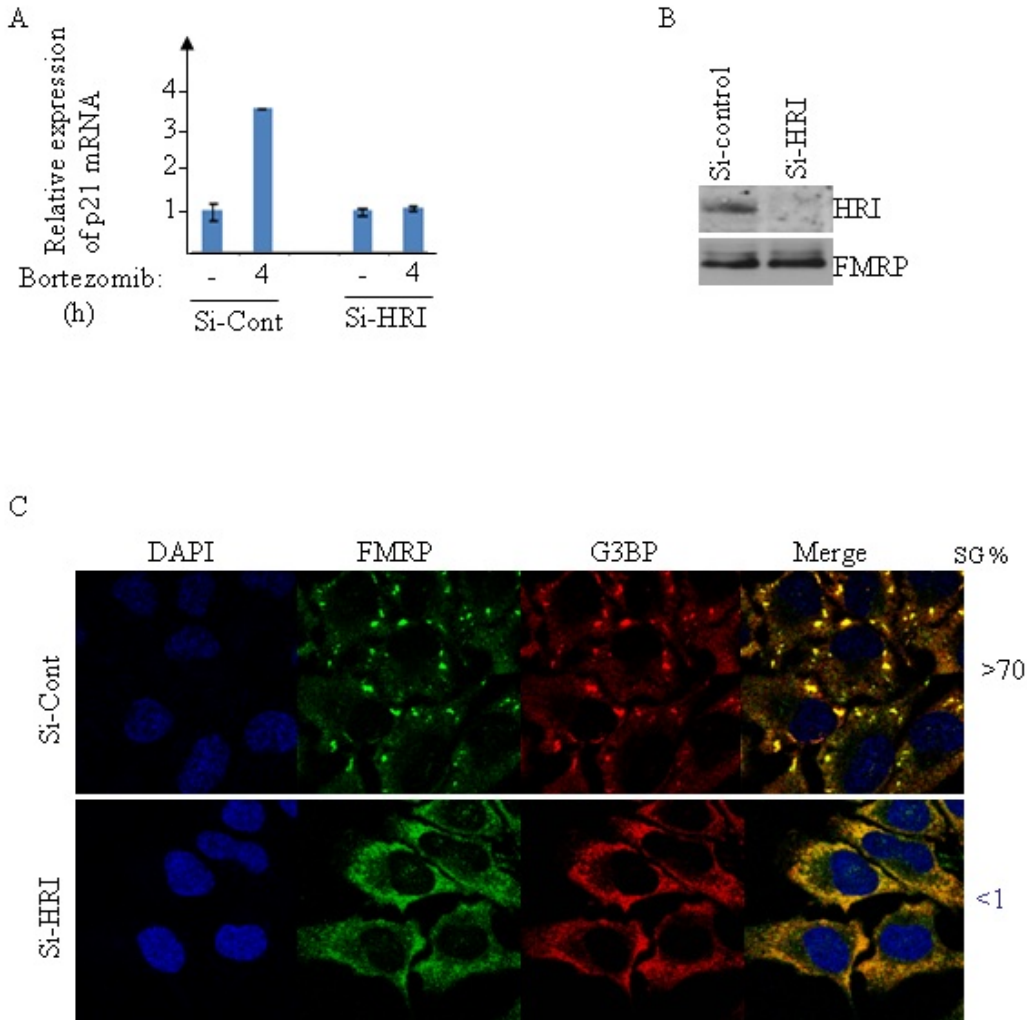


Figure 3-14 HRI depletion prevents bortezomib-induced SG formation and p21 mRNA accumulation.

(A-C) HeLa cells were treated with HRI-specific siRNA or with control siRNA, and then incubated with bortezomib (2 μ M) for 4 h. (A-B) Cells were harvested and their RNA and proteins content isolated. (A) Levels of p21 mRNA was measured by qRT-PCR and standardized against GAPDH mRNA as described in the legend of Figure 3.6. (B) Depletion of HRI was assessed by western blot using anti-HRI antibodies. (C) Cells were processed for immunofluorescence to detect SG using anti-G3BP and anti-FMRP antibodies. The percentage of cells harboring SG from five different fields and three different experiments containing a total of 1000 cells is indicated.

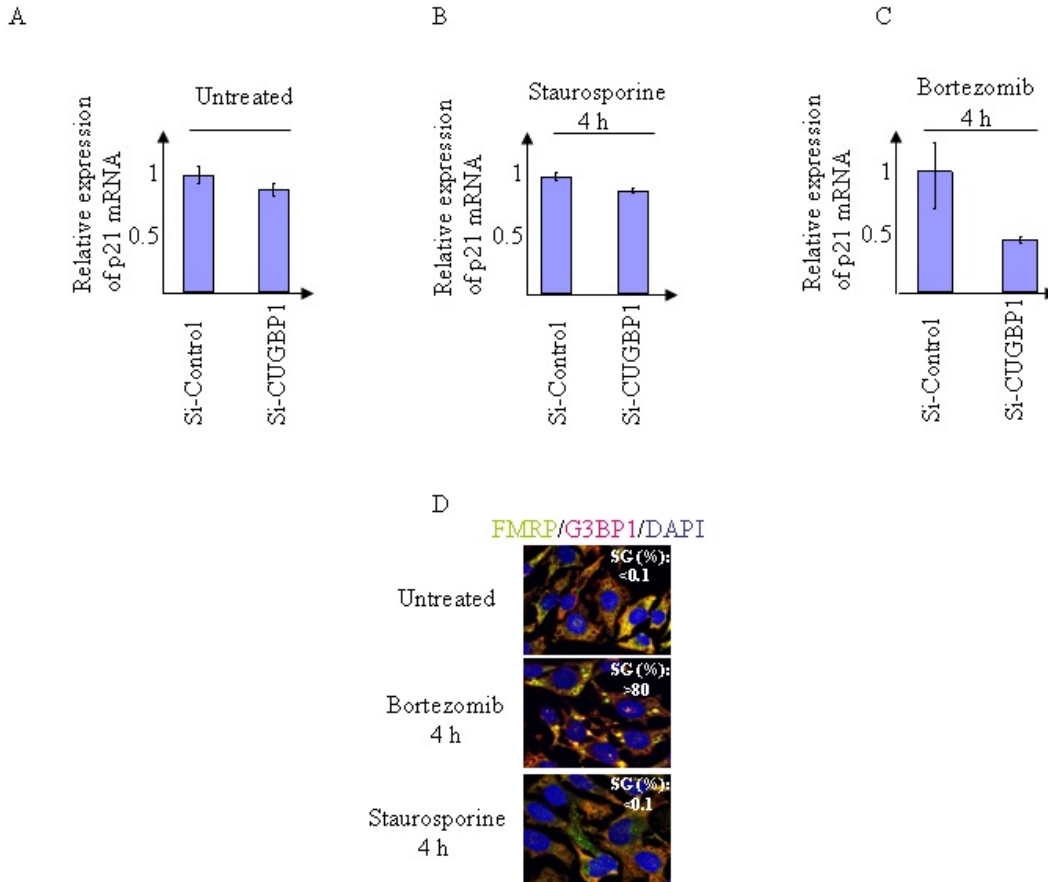


Figure 3-15 CUGBP1 depletion does not affect the steady-state level of the p21 mRNA in SG-free conditions tested.

(A-C) Seventy-two hours following transfection with CUGBP1, or control siRNAs, cells were left untreated (A), or were treated with 1 μ M staurosporine (B) or 2 μ M bortezomib (C) for 4 h, as indicated. Total RNA was isolated and the level of p21 mRNA expression was determined by qRT-PCR, standardized against GAPDH mRNA, and quantified as described in Figure 3.6. Results are expressed as a percentage of the mRNA levels present in mock-depleted cells. (D) Staurosporine treatment does not induce SG. HeLa cells were treated with bortezomib (2 μ M, 4 h) or Staurosporine (1 μ M, 4 h) then processed to visualize SG using anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies as described above. DAPI depicts nuclei. The percentage of SG is indicated at the top of each panel.

Bortezomib 4 h

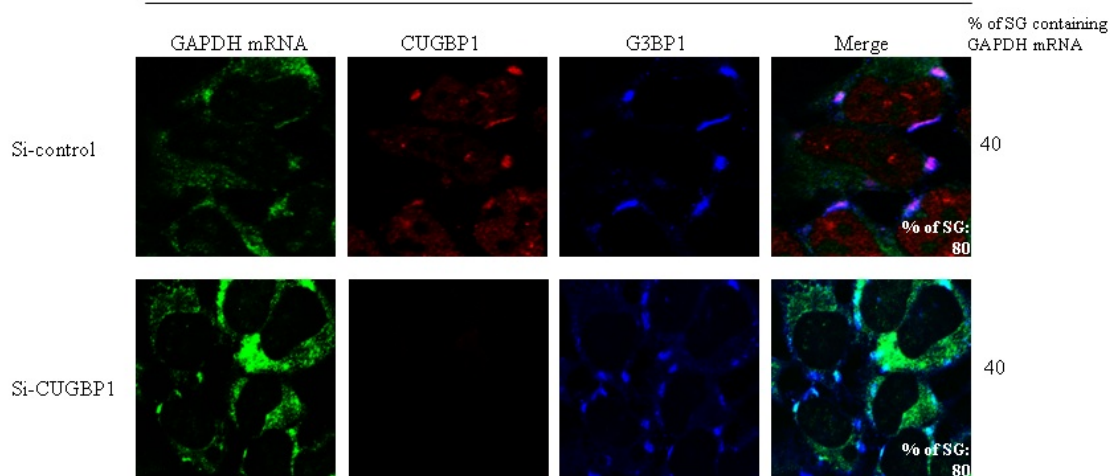


Figure 3-16 CUGBP1 depletion does not affect GAPDH mRNA localization in SG.

HeLa cells were treated with non-specific, or with CUGBP1-directed siRNA, incubated with bortezomib (2 μ M) for 4 h and processed for FISH to detect GAPDH mRNA coupled with immunofluorescence to visualize SG using antibodies against CUGBP1 and G3BP1 proteins. Immunofluorescence using anti-CUGBP1 antibodies is used to monitor CUGBP1 depletion. The percentage of SG is indicated at the bottom of the right panels. The percentage of cells harboring SG positives for GAPDH mRNA is also indicated. Those percentages are representative of typical results from three different experiments counting more than 1000 cells.

3.2.10. Acknowledgments

We are grateful to Drs. Sergio Di-Marco and Richard Poulin for providing helpful discussions and for editing the manuscript.

3.2.11. Footnotes

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Funding: This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grants (CIHR) (MOP-IC093226 and MOP-096454) and a Canadian Foundation for Innovation (CFI) grant (MOP-GF091050) to R. Mazroui. C. Gareau is recipient of a scholarship from the Faculty of Medicine at Laval University. R. Mazroui is a recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) research Scholars-Junior 1, and is a new investigator of CIHR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

3.2.12.References

1. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*.2004;5(5):417–21. [PubMed]
2. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*.2004;4(5):349–60. [PubMed]
3. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function.*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(3):855–60. [PMC free article] [PubMed]
4. Imajoh-Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S, Tanaka K, Omura S, et al. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells.*Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217(3):1070–7. [PubMed]
5. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem*. 1997;272(20):12893–6. [PubMed]
6. Sloss CM, Wang F, Liu R, Xia L, Houston M, et al. Proteasome inhibition activates epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR-independent mitogenic kinase signaling pathways in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5116–23.[PMC free article] [PubMed]
7. Richardson PG, Anderson KC. Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2003;1(10):596–600. [PubMed]
8. Richardson PG, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, et al. Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther*.2008;8(7):1053–72. [PubMed]
9. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, et al. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(3):665–75. [PubMed]
10. McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2008;11(4-5):164–79. [PubMed]
11. Rajkumar SV, Domingo-Domenech J, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):630–9.[PubMed]
12. Tang ZY, Wu YL, Gao SL, Shen HW. Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells. *J Surg Res*. 2008;145(1):111–23.[PubMed]
13. Rzymiski T, Milani M, Singleton DC, Anderson AL. Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle*. 2009;8(23):3838–47. [PubMed]
14. Fournier MJ, Anderson C, Anderson R. The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int*. 2010;10:12. [PMC free article][PubMed]
15. Moeller BJ, Cao Y, Anderson MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*. 2004;5(5):429–41. [PubMed]
16. Gardner LB. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol Cell Biol*. 2008;28(11):3729–41.[PMC free article] [PubMed]

17. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, et al. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 2006;17(10):4212–9. [PMC free article] [PubMed]
18. McInerney GM, Kedersha NL, Kaufman RJ, Anderson P, Anderson P. Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol Biol Cell*. 2005;16(8):3753–63. [PMC free article] [PubMed]
19. Kwon S, Zhang Y, Matthias P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev*. 2007;21(24):3381–94. [PMC free article] [PubMed]
20. Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell*. 2007;18(7):2603–18. [PMC free article] [PubMed]
21. Anderson P, Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(3):141–50. [PubMed]
22. Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(6):430–6. [PubMed]
23. Balagopal V, Parker R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(3):403–8. [PMC free article] [PubMed]
24. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell*. 2009;36(6):932–41. [PMC free article] [PubMed]
25. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, et al. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 2000;151(6):1257–68. [PMC free article] [PubMed]
26. Tsai NP, PC Ho, LN Wei. Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway. *Embo J*. 2008;27(5):715–26. [PMC free article] [PubMed]
27. Anderson P, Kedersha N. RNA granules. *J Cell Biol*. 2006;172(6):803–8. [PMC free article] [PubMed]
28. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, et al. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell*. 2002;13(1):195–210. [PMC free article] [PubMed]
29. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol*. 2008;10(11):1324–32. [PubMed]
30. Kim WJ, Back SH, Kim V, Ryu I, Jang SK. Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol*. 2005;25(6):2450–62. [PMC free article] [PubMed]
31. Kim WJ, Kim JH, Jang SK. Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *Embo J*. 2007;26(24):5020–32. [PMC free article] [PubMed]
32. Lian XJ, Gallouzi IE. Oxidative stress increases the number of stress granules in senescent cells and triggers a rapid decrease in p21waf1/cip1 translation. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8877–87. [PMC free article] [PubMed]

33. Adnane J, Jackson RJ, Nicosia SV, Cantor AB, Pledger WJ, et al. Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model. *Oncogene*. 2000;19(47):5338–47. [PubMed]
34. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. 2005;65(10):3980–5. [PubMed]
35. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21—negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;213(2):138–49. [PubMed]
36. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*. 1999;246(2):280–9. [PubMed]
37. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J*. 1999;18(5):1223–34. [PMC free article] [PubMed]
38. Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, Dulic V. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *Embo J*. 2003;22(15):3992–4002.[PMC free article] [PubMed]
39. Charrier-Savournin FB, Chateau M T, Gire V, Sedivy J, Piette J, et al. p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol Biol Cell*. 2004;15(9):3965–76. [PMC free article] [PubMed]
40. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(8):639–49. [PubMed]
41. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, et al. p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997;14(8):929–35.[PubMed]
42. Gorospe M, Wang X, Holbrook NJ. p53-dependent elevation of p21Waf1 expression by UV light is mediated through mRNA stabilization and involves a vanadate-sensitive regulatory system. *Mol Cell Biol*. 1998;18(3):1400–7. [PMC free article] [PubMed]
43. Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, et al. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol*. 2000;20(3):760–9. [PMC free article][PubMed]
44. Paillard L, Omilli F, Legagneux V, Bassez T, Maniey D, et al. EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *Embo J*. 1998;17(1):278–87. [PMC free article] [PubMed]
45. Timchenko NA, Cai ZJ, Welm AL, Reddy S, Ashizawa T, et al. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7820–6. [PubMed]
46. Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol*. 2001;21(20):6927–38. [PMC free article] [PubMed]
47. Lee JE, Lee JY, Wilusz J, Tian B, Wilusz CJ. Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One*. 2010;5(6):11201. [PMC free article] [PubMed]
48. Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J. CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *Rna*. 2006;12(6):1084–91. [PMC free article] [PubMed]

49. Rattenbacher B, Beisang D, Wiesner DL, Jeschke JC, von Hohenberg M, et al. Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol Cell Biol.* 2010;30(16):3970–80. [PMC free article] [PubMed]
50. Vlasova IA, Tahoe NM, Fan D, Larsson O, Rattenbacher B, et al. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell.* 2008;29(2):263–70. [PMC free article] [PubMed]
51. Webster PJ, Liang L, Berg CA, Lasko P, Macdonald PM. Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev.* 1997;11(19):2510–21. [PMC free article] [PubMed]
52. Zhang L, Lee JE, Wilusz J, Wilusz CJ. The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J Biol Chem.* 2008;283(33):22457–63. [PMC free article] [PubMed]
53. Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science.* 1998;280(5364):737–41. [PubMed]
54. Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, et al. Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *Embo J.* 2004;23(2):406–17. [PMC free article] [PubMed]
55. Kress C, Gautier-Courteille C, Osborne HB, Babinet C, Paillard L. Inactivation of CUG-BP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol Cell Biol.* 2007;27(3):1146–57. [PMC free article] [PubMed]
56. Fujimura K, Kano F, Murata M. Dual localization of the RNA binding protein CUGBP-1 to stress granule and perinucleolar compartment. *Exp Cell Res.* 2008;314(3):543–53. [PubMed]
57. Bence NF, Bennett EJ, Kopito RR. Application and analysis of the GFPu family of ubiquitin-proteasome system reporters. *Methods Enzymol.* 2005;399:481–90. [PubMed]
58. Salomons FA, Verhoef LG, Dantuma NP. Fluorescent reporters for the ubiquitin-proteasome system. *Essays Biochem.* 2005;41:113–28. [PubMed]
59. Cusack JC, Jr, Liu R, Xia L, Chao TH, Pien C, et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res.* 2001;61(9):3535–40. [PubMed]
60. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001;61(7):3071–6. [PubMed]
61. Lenz HJ. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(Suppl 1):41–8. [PubMed]
62. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993;75(4):805–16. [PubMed]
63. Liu Y, Yeh N, Zhu XH, Leversha M, Cordon-Cardo C, et al. Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1). *Embo J.* 2007;26(22):4683–93. [PMC free article] [PubMed]

64. Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell*. 2004;7(5):637–51. [PubMed]
65. Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene*. 2000;19(10):1346–53. [PubMed]
66. Zhan J, Easton JB, Huang S, Mishra A, Xiao L, et al. Negative regulation of ASK1 by p21Cip1 involves a small domain that includes Serine 98 that is phosphorylated by ASK1 in vivo. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3530–41. [PMC free article] [PubMed]
67. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Boilard N, Labelle Y, et al. Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs. *Hum Mol Genet*. 2003;12(23):3087–96. [PubMed]
68. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, et al. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet*. 2002;11(24):3007–17. [PubMed]
69. Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, et al. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *Embo J*. 2004;23(15):3092–102. [PMC free article] [PubMed]
70. Mazroui R, Di Marco S, Clair E, von Roretz C, Tenenbaum SA, et al. Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol*. 2008;180(1):113–27. [PMC free article] [PubMed]
71. Lazzarini R, Moretti S, Orecchia S, Betta PG, Procopio A, et al. Enhanced antitumor therapy by inhibition of p21waf1 in human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5099–107. [PubMed]
72. Crescenzi E, Palumbo G, de Boer J, Brady HJ. Ataxia telangiectasia mutated and p21CIP1 modulate cell survival of drug-induced senescent tumor cells: implications for chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(6):1877–87. [PubMed]
73. Ferrandiz N, Caraballo JM, Albajar M, Gomez-Casares MT, Lopez-Jorge CE, et al. p21(Cip1) confers resistance to imatinib in human chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Lett*. 2010;292(1):133–9. [PubMed]
74. Suzuki A, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, et al. Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ*. 2000;7(8):721–8. [PubMed]
75. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 2001;3(3):245–52. [PubMed]
76. Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol*. 1999;19(5):3842–7. [PMC free article] [PubMed]
77. Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Akahane M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene*. 1998;17(8):931–9. [PubMed]

78. Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, Akahane K. Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene*. 1999;18(5):1239–44. [PubMed]
79. Gabai VL, Sherman MY. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol*. 2002;92(4):1743–8.[PubMed]
80. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem*.1998;273(11):6373–9. [PubMed]
81. Seomun Y, Kim JT, Kim HS, Park JY, CK Joo. Induction of p21Cip1-mediated G2/M arrest in H2O2-treated lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2005;11:764–74. [PubMed]
82. Kedersha N, Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol*. 2007;431:61–81. [PubMed]
83. Mokas S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, et al. Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell*. 2009;20(11):2673–83.[PMC free article] [PubMed]
84. Lin WJ, Duffy A, Chen CY. Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J Biol Chem*. 2007;282(27):19958–68.[PubMed]
85. Salisbury E, Sakai K, Schoser B, Huichalaf C, Schneider-Gold C, et al. Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp Cell Res*. 2008;314(11-12):2266–78.[PMC free article] [PubMed]
86. De Silanes IL, Gorospe M, Taniguchi H, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. The RNA-binding protein HuR regulates DNA methylation through stabilization of DNMT3b mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(8):2658–71. [PMC free article] [PubMed]
87. Pullmann R, Jr, Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, et al. Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol Cell Biol*. 2007;27(18):6265–78. [PMC free article] [PubMed]
88. Van der Giessen K, Di-Marco S, Clair E, Gallouzi IE. RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem*. 2003;278(47):47119–28.[PubMed]
89. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res*. 2008;68(3):631–4. [PubMed]

4. Discussion

Dans cette première étude, j'ai démontré pour la première fois que la formation des GS dans les cellules cancéreuses suite à un traitement chimiothérapeutique est possible. L'agent chimiothérapeutique utilisé dans tous mes travaux est un inhibiteur du protéasome connu sous le nom de bortezomib (Bz). La formation de GS dû au Bz corrèle avec l'inhibition de l'initiation de la traduction qui est provoquée par la phosphorylation du facteur eIF2 α , activée majoritairement par la kinase de stress HRI. De manière significative, nous avons trouvé que la déplétion de HRI inhibe la formation des GS en réponse au Bz. L'inhibition des GS suite à la déplétion de HRI corrèle avec une mort cellulaire accrue. Ceci révèle un rôle crucial pour HRI, en partie via sa capacité à induire les GS, dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses au Bz. Dans une seconde étude connexe, je démontre que l'ARNm p21, étant hautement instable, est emprisonné à l'intérieur des GS dépendantes de HRI, lors d'un traitement de Bz. La séquestration de l'ARNm p21 à l'intérieur des GS permet à celui-ci d'être protégé contre sa dégradation et donc permet son accumulation. Les mécanismes exacts qui régissent la stabilisation de l'ARNm p21 à l'intérieur des GS, restent encore inconnus. Toutefois, nous avons établi que la protéine de liaison à l'ARN, nommée CUGBP1, est responsable de la localisation de l'ARNm p21 à l'intérieur des Bz-GS, induisant ainsi sa stabilisation et son accumulation. Après un traitement prolongé de Bz, les GS sont désassemblées, relâchant ainsi l'ARNm p21 accumulé, ce qui le rend disponible pour sa traduction. La traduction massive du facteur anti-apoptotique p21 favorise la résistance des cellules cancéreuses à la mort induite par le Bz. Nos études suggèrent un nouveau modèle dans lequel la formation des GS est impliquée dans la chimiorésistance (Figure 4.1).

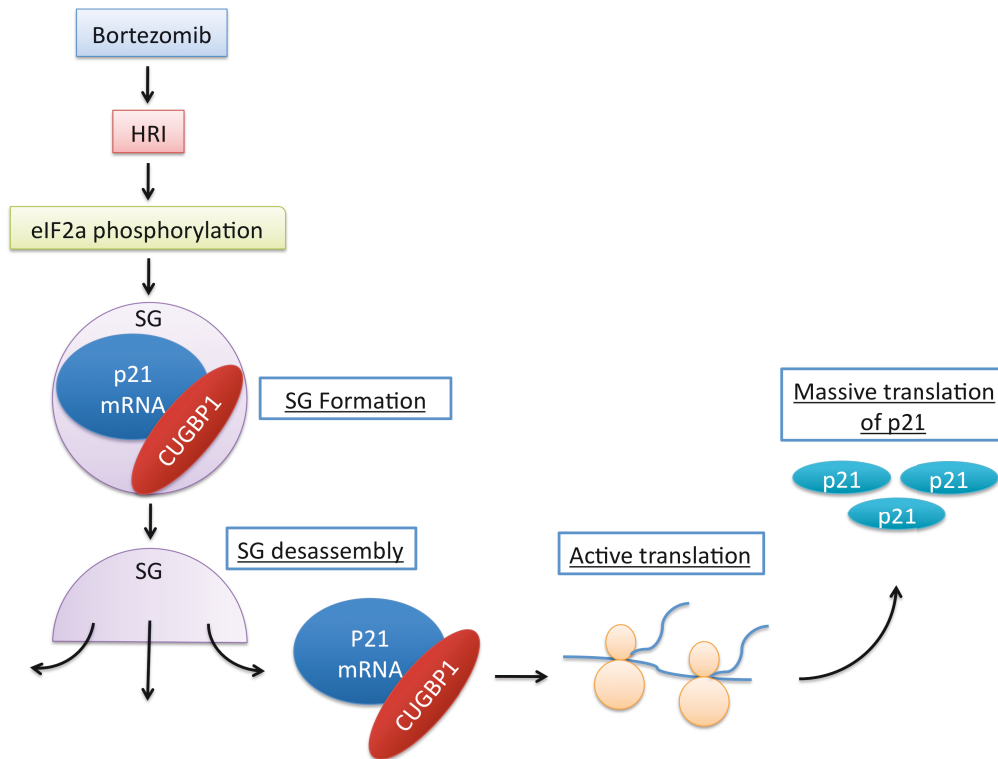


Figure 4-1 La voie anti-apoptotique médiée par l'ARNm p21, CUGBP1, et les GS en réponse au Bortézomib.

L'ARNm p21, par l'intermédiaire de son partenaire protéique CUGBP1, est acheminé à l'intérieur des GS en réponse au Bortézomib. Une fois dans les GS, l'ARNm p21 est protégé du stress, et donc peut être stabilisé et accumulé. Lorsque les GS se désassemblent, CUGBP1 participe à l'acheminement de l'ARNm aux polyribosomes pour qu'il y soit traduit. La forte accumulation de l'ARNm entraîne ainsi une traduction massive du facteur anti-apoptotique p21, promouvant un élan anti-apoptotique chez la cellule. Ce mécanisme protégerait alors les cellules cancéreuses contre la chimiothérapie, créant ainsi le phénomène de chimiorésistance.

Plusieurs travaux ont décrit le rôle des GS dans la résistance cellulaire face à l'apoptose induite par l'arsénite [9,136,137]. Il a également été démontré que le facteur HRI, promoteur de GS en conditions de Bz, joue un rôle anti-apoptotique dans d'autres contextes. Dans une étude antérieure, McEwen et al. démontrent que des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de HRI ne peuvent former les GS en réponse à l'arsénite et de par ce fait sont incapables de survivre à ce stress. Plus récemment, le Dr Anderson et son équipe ont découvert que HRI est requis pour la formation des GS dans les cellules érythroïdes soumises au stress oxydatif et encore une fois, ces cellules devenaient incapables de survivre au stress en absence de HRI. Notre étude apporte une première évidence pour laquelle HRI possède un rôle important dans les cellules cancéreuses. De ce fait, nous démontrons que l'activation de HRI promeut la résistance des cellules cancéreuses face à l'apoptose engendrée par le Bz, en partie grâce à la formation des GS. En effet, l'étude du niveau d'HRI faite à partir d'une multitude de lignées cellulaires de cancers supporte cette dernière assomption. Alors que les cellules cancéreuses résistantes au Bz, telles que les cellules de cancer du sein

MCF7 et TD43 et les cellules de cancer de la prostate LNCaP montrent des niveaux élevés d'activation de HRI, corrélant avec la formation des GS, les cellules cancéreuses sensibles au Bz telles que les cellules de cancer du sein Hst578 et MDA-MB-231, elles, présentent des niveaux d'activation de HRI très faibles, corrélant avec leur incapacité à former les GS (résultats non présentés). Nous croyons alors que la résistance des cellules cancéreuses face au Bz provient en partie de la présence des GS, qui elle, semble être liée à l'activation de HRI. Cependant, comment HRI est activé lors d'un traitement de Bz reste encore à être étudié.

La kinase HRI est connue pour être activée principalement par une hyper-autophosphorylation. Il existe quelques hypothèses à ce qui induit l'hyper-phosphorylation de HRI. Tout d'abord, HRI est mieux connu pour être activé en conditions de déficience en hème. HRI possède deux domaines de liaison à l'hème (Figure 1.11). Lorsque l'hème est suffisamment présente dans la cellule, celle-ci se fixe au domaine de liaison à l'hème situé entre les domaines kinases de HRI, ce qui nuit au domaine catalytique de HRI et donc empêche HRI de phosphoryler eIF2 α . En absence de l'hème, le domaine kinase de HRI est libéré, permettant ainsi à HRI de s'autophosphoryler. Les protéines de choc thermique, surtout Hsp90 et Hsp72, ont démontré réguler HRI dans des cellules érythroïdes soumises à différents stress [138]. L'activation de HRI par Hsp90 a été proposée d'être dû à ses activités de chaperon menant à l'acquisition et au maintien de la conformation hyper phosphorylée de HRI [139]. Hsc73 (Hsc70) et Cdc34 sont également d'autres chaperons requis pour le repliement initial et la maturation de HRI. Hsc73 est un membre de la famille de Hsp70 et garde HRI sous une forme latente. Lorsque des protéines dénaturées s'accumulent suite à un choc thermique, ces protéines interagissent avec Hsc73 et inhibent l'association entre HRI et Hsc73. Cette dissociation entre Hsc73 et HRI conduit à l'autophosphorylation et à l'activation de HRI [140]. Par conséquent, Hsc73 peut réguler négativement l'activation de HRI. Ainsi, se pourrait-il que l'accumulation de protéines ubiquitinilées, en raison de l'inhibition du protéasome, inhibe l'interaction entre Hsc73 et HRI, induisant ainsi l'activation de ce dernier? Pour cela, des expériences d'immunoprécipitations, vérifiant l'interaction de Hsc73 avec HRI, pourraient être effectuées en conditions de Bz. De plus, il a été décrit que le mécanisme d'activation d'HRI dépendant de la dissociation de Hsc73 est indépendant de l'hème [141], ce qui suggère que ce mécanisme pourrait être impliqué dans notre modèle de cellules non érythrocytaires.

HRI a également été montré pour être activé par le stress oxydatif induit par l'arsénite au moyen d'un mécanisme qui comprend l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Comment les ROS induisent l'hyper-phosphorylation et l'activation de HRI, reste à être défini. Cependant, des études suggèrent que les ROS peuvent moduler les protéines de deux manières. La première hypothèse est que les ROS oxydent directement les cystéines des protéines cibles et modifient alors leurs conformations et leurs activités. La seconde hypothèse est que les ROS activeraient HRI à travers des protéines sensibles à l'oxydoréduction et riches en cystéines, telles que la thiorédoxine et le glutathion[138]. Les cystéines sont des acides aminés

faisant partie des domaines de liaison à l'hème et sont essentielles à la liaison de l'hème [100]. À partir de ces hypothèses, nous avons testé l'implication de Hsp90, et des ROS dans la formation des GS en réponse au Bz.

La geldanamycine (GA) est un composé dérivé de l'ansamycine benzoquinone, qui inhibe Hsp90 à travers son activité ATPase [142]. Nous avons constaté que le traitement des cellules HeLa avec la GA, réduit de manière significative la formation des GS lors de l'exposition au Bz (résultats non présentés). Ce résultat préliminaire suggère un rôle pour Hsp90 dans l'activation de HRI lors du traitement de Bz. Pour compléter ce résultat, il serait intéressant d'inhiber Hsp90 par une différente approche telle que par l'utilisation de SiRNAs ciblant spécifiquement Hsp90. Enfin, nos résultats les plus prometteurs ont été trouvés en inhibant les ROS avec un chélateur contenant un thiol (N-acetyl-L-cysteine (NAC)), capable d'inhiber directement les ROS. Le NAC, en association avec le Bz, inhibe efficacement la formation des GS dans les cellules HeLa. Le NAC réduit de façon significative l'activation de HRI et par conséquent réduit la phosphorylation de eIF2 α (voir le mémoire de M. David Martel, Université Laval; Rôle et implications de la protéine HRI dans la réponse cellulaire face au stress, 2013). Nos résultats, impliquant le NAC, définissent les ROS comme des précurseurs de l'activation de HRI dans les conditions de Bz. Nous pensons que l'inhibition du protéasome induite par le Bz inflige, en partie, à la cellule un stress oxydatif grâce à la production de ROS, qui contribue à l'activation de HRI. En somme, Hsp90 est une kinase chaperon qui se lie aux HRI nouvellement synthétisés et donc module leurs repliements et leurs maturations, tandis que les ROS activent l'hyper-phosphorylation des HRI matures. Le Bz semble affecter tant Hsp90 que l'accumulation des ROS pour en activer HRI, qui est crucial pour la formation des Bz-GS.

Les ROS ont auparavant été impliqués dans le cancer. En effet, des taux élevés de ROS ont été observés dans la plupart des types de cancers. Ces taux élevés de ROS participeraient au développement et à la progression tumorale [143,144]. Toutefois, il est également connu qu'un niveau surélevé de ROS peut être létal pour la cellule cancéreuse. De manière intéressante, les GS formées par le stress oxydatif semblent freiner la surproduction de ROS par la séquestration de protéines pro oxydantes, telles que G3BP [51]. Cependant, les ROS sont également impliqués dans la formation de GS suite au stress oxydatif, ce qui implique l'existence d'une possible boucle régulatrice à rétroaction négative entre les ROS et les GS. La validation d'une telle boucle négative contribuant à la résistance des cellules cancéreuses contre le Bz reste à être étudiée. Je suggère alors un modèle dans lequel les ROS induits par un stress oxydatif, imposé par l'inhibition du protéasome, activent HRI, qui à son tour signale la formation de GS. La formation de GS amortit alors la surproduction de ROS et atténue le stress mortel imposé par le Bz causant la chimiorésistance. De nos jours, les suppléments en antioxydants se sont révélés à être avantageux dans de nombreux volets de la santé. De cela, il serait intéressant de tester si par exemple un supplément d'antioxydant, peut réduire la formation de GS, en réduisant la production initiale de ROS, et ainsi sensibiliser les cellules cancéreuses au

Bz. Une étude d'expression génique réalisée chez une multitude de lignées cellulaires de lymphomes démontre une corrélation entre la régulation positive élevée d'antioxydants et la sensibilité des cellules au Bz [145]. Toutefois, le bon niveau d'antioxydant requis pour obtenir une réponse positive au Bz peut s'avérer difficile à déterminer puisque comme pour le niveau des ROS, une dose trop élevée d'antioxydants peut également être négative dans un contexte de cancer [145]. De plus, une grande attention quant au choix d'antioxydant utilisé, doit être portée. Comme le démontre le Dr Perrone dans une étude publiée dans *Nature* en 2009, l'agent antioxydant vitamine C inhibe significativement l'activité du Bz causant ainsi la chimiorésistance des myélomes. Cet effet inhibiteur de la vitamine C serait réservé à la classe des inhibiteurs de protéasome de type boronate. Le groupe hydroxyl –OH de la vitamine C interagirait directement avec l'acide boronique du Bz et diminuerait alors l'affinité de ce dernier pour le protéasome [146]. En somme, ces dernières hypothèses et résultats suggèrent que l'activation de HRI, dans un contexte *in vitro* de cellules cancéreuses issues de tumeurs primaires, favorise la résistance de ces cellules face au traitement.

Cependant, l'activation de HRI par un composé récemment breveté, le N'N'diarylurea, démontre à réguler négativement l'expression d'oncoprotéines, à inhiber la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses et à inhiber la croissance de tumeurs mammaires humaines xénogreffes chez les souris [147]. Ce qui démontre que HRI, de par son activation, possède également un rôle anti-cancer dans certains contextes. Ainsi, toutes ces études indiquent que le rôle de HRI dans le cancer est complexe et peut dépendre des stimuli qui mènent à son activation et peut même dépendre du niveau de son activation. Pour l'instant, nos études *in vitro* suggèrent que HRI favorise la chimiorésistance.

Pour supporter davantage le rôle de HRI dans la chimiorésistance, nous avons établi des cellules HeLa déplétées pour HRI, à l'aide de ShRNAs. Les cellules HeLa exprimant des ShRNA sans cibles sont utilisées comme contrôle. Les cellules HeLa-ShRNA sont ensuite implantées sur la membrane chorioallantoïque d'un embryon de poulet âgé de 10 jours, en vue d'obtenir des tumeurs xénogreffes *in ovo*. Les expériences *in ovo* (« CAM assay ») ont révélé que les tumeurs formées à partir de cellules ShHRI, poussent beaucoup moins que les tumeurs contrôles et même 50 % d'entre elles ne se développent pas du tout (Figure 4.2), et ceci sans aucun traitement. De plus, j'ai également observé lors de la récolte des tumeurs ShHRI *in ovo*, que ces tumeurs étaient beaucoup moins vascularisées que les tumeurs contrôles.

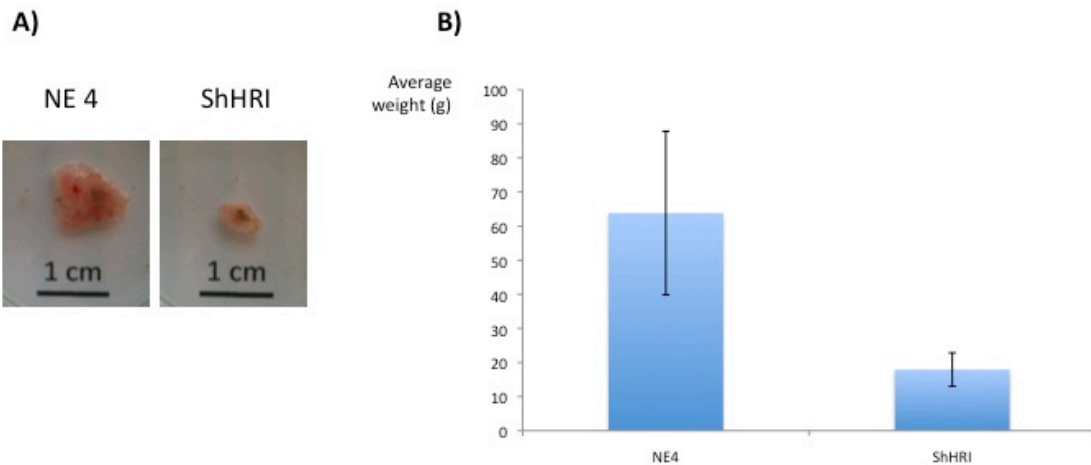


Figure 4-2 La déplétion d'HRI diminue le développement tumoral chez les tumeurs xénogreffes d'embryon de poulet.

A) Après 10 jours d'incubation de l'œuf, 3 millions de cellules contrôle (NE4) ou déplétées de HRI (ShHRI) sont déposées sur la membrane chorioallantoïque (CAM). Sept jours plus tard, les tumeurs sont récoltées et pesées. B) Ce graphique représente le poids moyen des tumeurs récoltées lors de 3 expériences différentes, chaque expérience comptant 15 œufs.

Ce résultat est surprenant, car la déplétion de HRI *in vitro* ne semble pas influencer la croissance cellulaire, ce qui impliquerait un rôle important pour HRI dans des mécanismes plus tardifs de la tumorigénèse, par exemple dans le mécanisme de l'angiogenèse. Jusqu'à maintenant un rôle pour HRI dans l'angiogenèse n'a jamais été décrit pourtant son implication dans la traduction des ARNms dans les cellules sanguines soulève un lien possible entre ces deux processus. De plus, nos études de « microarray » ont identifié un lien entre HRI et l'expression de ephrin-A1 (EFNA1) et du facteur « Fibroblast Growth Factor 2 » (FGF2). EFNA1 fait partie de la famille des ephrines qui font partie d'une des plus grandes sous-familles de récepteurs à protéines tyrosine kinase. Le gène EFNA1 possède des fonctions dans l'érythropoïèse et comporte un rôle important dans l'angiogenèse et dans la néovascularisation des tumeurs. Le facteur pro angiogénique FGF2 est reconnu pour être un puissant mitogène pour les cellules endothéliales vasculaires et son administration exogène, stimulerait l'angiogenèse chez la souris [148]. Notre analyse transcriptome chez les cellules HeLa montre que les niveaux des ARNms EFNA1 et FGF2 sont significativement diminués suite à la déplétion de HRI. Nous pensons que cet effet est indirect. L'absence de HRI permettrait la traduction de facteurs de la transcription qui en temps normal agissent comme des répresseurs de la transcription des ARNms EFNA1 et FGF2. L'effet négatif de la déplétion de HRI sur la croissance tumorale et l'angiogenèse observée *in ovo*, serait alors dû, en partie, à l'inhibition de l'expression de facteurs d'angiogenèse tels que EFNA1 et FGF2.

Toutefois, des études supplémentaires utilisant ces mêmes lignées cellulaires exprimant de façon stable les ShHRI, seront nécessaires pour tester le rôle de HRI dans le développement tumoral et la chimiorésistance

chez des modèles de souris. Les expériences de visualisation des GS dans les tumeurs sont aussi nécessaires pour valider le rôle de HRI dans la formation des GS *in vivo*. Ces expériences de visualisation des GS *in vivo* sont toutefois difficiles à évaluer, dû à la cinétique d'assemblage/désassemblage des GS. Pour cela, un suivi attentif d'études cinétiques, impliquant l'extraction de tumeurs à différents moments et de la cryogénéisation ou de la paraffination instantanée de ces tumeurs, devra être fait afin de visualiser la formation de GS *in vivo*.

Comme indiqué précédemment, les GS peuvent favoriser la résistance cellulaire face à l'apoptose en séquestrant des facteurs pro-apoptotiques tels que RACK1 et TRAF2. Les GS sont également connues pour piéger, protéger et stabiliser des ARNm spécifiques tels que c-myc et VEGF, pour promouvoir la survie cellulaire. Nous avons, ainsi que d'autres, observé que les GS, induites par l'inhibiteur de protéasome MG132, promeuvent la stabilisation de l'ARNm p21. Puisque p21 affecte la mort cellulaire causée par le stress, j'ai décidé d'enquêter sur la contribution des GS dans la résistance des cellules cancéreuses face à l'apoptose engendrée par le Bz, par l'entremise d'une surexpression de p21. Mes résultats supportent ainsi le modèle suivant: nous avons constaté que (i) la régulation positive de la transcription de l'ARNm p21, induite par le Bz, augmente transitoirement l'abondance d'ARNm p21; (ii) la séquestration de cette réserve d'ARNm p21 au sein des GS protège cet ARNm instable contre la dégradation; (iii) au moment du désassemblage des GS, qui survient après une période prolongée d'inhibition du protéasome, une grande quantité d'ARNm p21 est alors rapidement traduite, déclenchant ainsi un pic élevé d'expression de p21 qui contribue à empêcher l'apoptose, malgré l'inhibition du protéasome. En utilisant une approche par candidats, nous avons identifié CUGBP1 comme étant une protéine de liaison à l'ARN clé, nécessaire à la localisation et à la stabilisation de l'ARNm p21 dans les GS, et donc étant également importante pour l'expression de p21. Notre conclusion que CUGBP1 favorise la stabilisation de l'ARNm p21, lors d'une inhibition du protéasome est surprenante, car cette protéine fut initialement décrite comme étant un facteur promouvant la dégradation d'ARNms [131,149]. Ces études ont identifié CUGBP1 comme étant un facteur favorisant la déstabilisation d'ARNms cibles en se liant à leurs éléments UGUUUGUUUGU situés en 3'UTR [131]. Par contre, l'ARNm p21 ne possède pas cette séquence déstabilisatrice dans son 3'UTR excluant par conséquent un rôle pour CUGBP1 dans la déstabilisation de l'ARNm p21 par liaison à l'élément UGUUUGUUUGU. En outre, CUGBP1 permet la traduction de l'ARNm p21 dans les cellules sénescents, ce qui soutient un rôle possible pour CUGBP1 comme régulateur positif de l'expression de p21 [150]. Dans cette étude, la liaison de l'ARNm p21 à CUGBP1 a été repérée dans l'extrémité 5' de l'ARNm p21. Si CUGBP1 se lie à ce même élément pour promouvoir la stabilisation de l'ARNm p21 dans les GS, engendrées par le Bz, reste encore inconnue. Afin de définir la séquence de l'ARNm p21 responsable de l'interaction avec CUGBP1, la séquence de l'ARNm p21 pourrait être divisée en fragments en vue d'identifier quelle région est importante pour cette interaction. Le fragment identifié peut ainsi être divisé à nouveau jusqu'à ce que les quelques nucléotides responsables soient

identifiés. Dans des conditions de Bz, les différentes régions de l'ARNm p21, isolées sur différents fragments, peuvent être testées pour leur interaction avec CUGBP1 par expérience de décalage sur gel (« gel shift assay »). Pour cela, les différents fragments de la séquence de l'ARNm p21 sont marqués par radioactivité (α - ^{32}P) et sont ensuite incubés avec des extraits cellulaires. Ces extraits cellulaires proviennent de cellules préalablement traitées au Bz et qui sont déplétées, ou non, de CUGBP1 à l'aide de SiRNAs. Suite à un traitement à la RNase, les extraits incubés avec les sondes sont déposés sur un gel de polyacrylamide. Les complexes protéiques formés avec les sondes ARN sont révélés par autoradiographie. Si la sonde correspondante au fragment de l'ARNm se lie à CUGBP1, il y aura présence d'un complexe dans les extraits de cellules non déplétées de CUGBP1, et ce complexe sera normalement absent dans les extraits de cellules déplétées de CUGBP1. Comme expérience complémentaire, on réalisera le « super-shift », qui consiste à ajouter l'anticorps CUGBP1 aux extraits cellulaires, ce qui augmente la taille du complexe et ralentit davantage la migration du complexe sur gel, si bien sûr CUGBP1 est présent dans le complexe. Cette expérience complémentaire valide la présence de CUGBP1 dans le complexe observé.

Il serait également intéressant de valider que l'interaction CUGBP1/ARNm p21 est fonctionnelle dans notre modèle, en analysant par expériences d'hybridation in situ (FISH) la localisation de ces fragments de séquence dans les GS en conditions de Bz, en présence et absence de CUGBP1. Il serait également intéressant de déterminer si CUGBP1 favorise la stabilisation de l'ARNm p21 en piégeant celui-ci une fois qu'il est localisé dans les GS, ou au contraire en le recrutant à partir de sites distaux dans la cellule, comme au niveau du noyau. Dans ce contexte, il est important de noter que, bien que la majeure partie de CUGBP1 soit nucléaire dans des conditions de croissance normale des cellules, celui-ci s'accumule fortement dans les GS suite au traitement de Bz. Mes études de quantification indiquent que les protéines CUGBP1 présentes dans les GS proviennent principalement du noyau (voir Résultats 3.2 « p21WAF1/CIP1 Upregulation through the Stress Granule-Associated Protein CUGBP1 Confers Resistance to Bortezomib-Mediated Apoptosis »). Ceci suggère également que CUGBP1 peut se lier à l'ARNm p21 directement à partir du noyau pour l'acheminer dans les GS. Sur ce, une étude récente faite par Zid BM et O'Shea EK chez la levure, a révélée un nouveau concept qui implique que les séquences promotrices de gènes peuvent affecter l'expression de leurs ARNm au cours d'un stress, en régulant leurs localisations soit dans des granules à ARN pour leurs répressions ou aux polyribosomes pour leurs expressions. Les auteurs suggèrent qu'un des mécanismes sous-jacents à ce concept pourrait impliquer le recrutement de RBPs au voisinage de promoteurs spécifiques et actifs pour que ces RBPs se lient directement aux ARNm cibles naissants et ainsi acheminer ceux-ci à des endroits spécifiques de la cellule pour en réguler leurs expressions[151]. Ainsi, il est tentant de proposer que l'inhibition du protéasome induise le recrutement de CUGBP1 au promoteur de p21 pour en faciliter la liaison de CUGBP1 à l'ARNm p21 naissant, à son site de transcription, et ainsi promouvoir son recrutement aux GS

(Figure 4.3). De plus, CUGBP1 fut originalement décrit comme un facteur qui régule l'épissage des ARN pré-messagers pendant leur transcription, indiquant qu'il peut être recruté à des sites où la transcription est active. Des études de CHIP-IP peuvent apporter des premiers éléments de réponse à cette hypothèse. Aussi, pour le moment, comment CUGBP1 interagit avec l'ARNm p21 dans les conditions de Bz, reste encore à être clarifié.

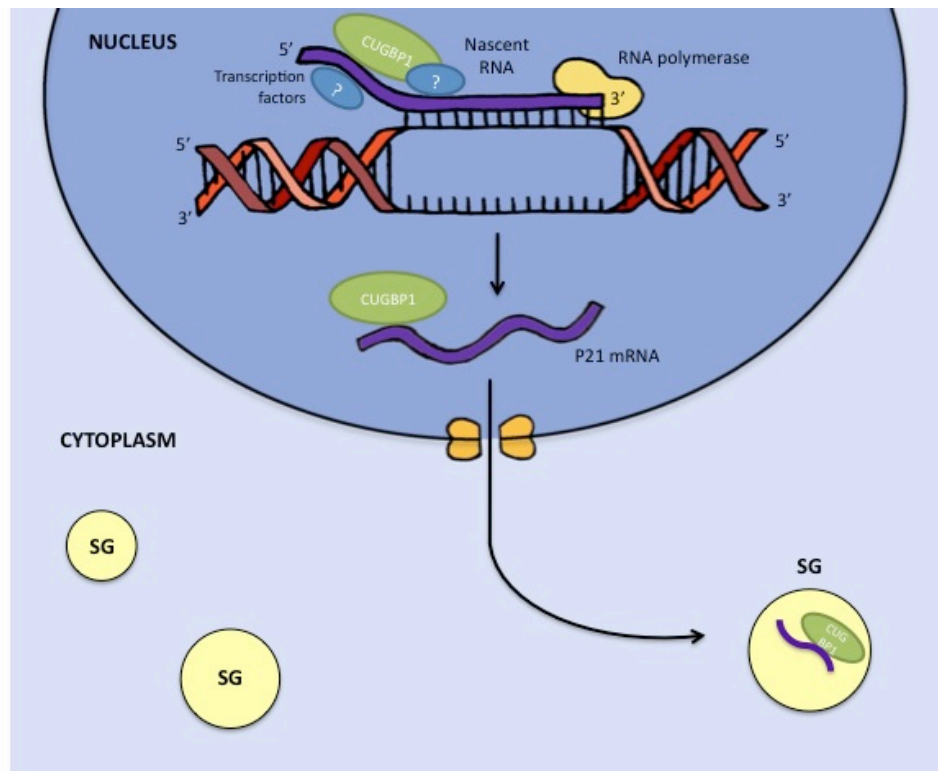


Figure 4-3 Schématisation de l'hypothèse par laquelle CUGBP1 recruterait l'ARNm p21 à son site de transcription dans le noyau.

À partir du nouveau concept de Zid et O'Shea, nous proposons que CUGBP1, étant nucléaire et en partie réacheminé aux GS en conditions de stress, puisse être recruté, peut-être par l'entremise de facteurs de transcriptions, au promoteur du gène codant pour l'ARNm p21. L'ARNm p21 naissant interagirait alors avec CUGBP1, en sa séquence 5'. Comme mentionné plus haut, Lakova P. et al. ont identifié que CUGBP1 se lie dans la partie 5' de l'ARNm p21, dans des fibroblastes humains sénescents. Ceci suggère également que CUGBP1 pourrait alors acheminer l'ARNm à être épissé. En effet, CUGBP1 est bien connu pour posséder un rôle important dans l'épissage d'ARNms. Selon notre hypothèse CUGBP1 acheminerait alors l'ARNm p21 du noyau aux GS en conditions de Bz.

Nos expériences préliminaires utilisant des mutants CUGBP1 indiquent que le domaine Linker et possiblement le domaine RRM2, sont essentiels pour la localisation de CUGBP1 à l'intérieur des GS (résultats non présentés). Il serait intéressant de vérifier si CUGBP1 dépourvu de son domaine Linker est incapable d'acheminer l'ARNm p21 à l'intérieur des GS et donc est incapable de promouvoir la stabilisation de l'ARNm p21. Cette implication du domaine Linker dans la relocalisation de CUGBP1 est intéressante puisque ce domaine possède plusieurs sites de phosphorylation. La plupart de ces sites de phosphorylation situés dans la

région Linker sont activés par la kinase GSK3. Le domaine Linker possède également deux autres sites de phosphorylation, contrôlés par la kinase PKC et enfin, un dernier site, la sérine-302 contrôlée par la kinase CDK4 (Figure 1.13). En effet, la phosphorylation de la sérine 302 par la kinase CDK4 a démontré promouvoir une interaction entre CUGBP1 et l'ARNm p21 dans les cellules normales [135]. Le domaine RRM2 ne contient qu'un seul site de phosphorylation, la thréonine-163, qui est contrôlé par la kinase PKC (Figure 1.13). Par conséquent, il serait intéressant de vérifier l'implication de ces sites de phosphorylation et des kinases qui leur sont associés, dans la stabilisation de l'ARNm p21 par les GS, favorisant ainsi la chimiorésistance contre le Bz. Des expériences d'immunoprecipitation de CUGBP1 suivies d'une déphosphorylation utilisant la phosphatase alcaline (CIP) sont en cours, afin de déterminer si CUGBP1 est phosphorylé dans des conditions de Bz. Si tel est le cas, des expériences de « knockdown » ciblant les kinases spécifiques qui phosphorylent CUGBP1 pourraient être faites pour vérifier ce qui active CUGBP1. En outre, des études de mutation par point pourraient alors être effectuées afin d'identifier spécifiquement les sites de phosphorylation responsables pour l'activation de CUGBP1. Ces études de mutagenèse et de déplétion peuvent alors être combinées pour vérifier l'effet de la phosphorylation de CUGBP1 sur la localisation et la stabilisation de l'ARNm p21. Je crois que la phosphorylation de CUGBP1 pourrait être impliquée dans la relocalisation de CUGBP1 avec l'ARNm p21 à l'intérieur des GS, pour permettre à l'ARNm p21 d'être stabilisé. Comment l'ARNm p21 est stabilisé dans les GS demeure une question importante à laquelle nous devons répondre.

En général, le processus de dégradation d'un ARNm commence par deux processus qui impliquent l'enlèvement de la coiffe en 5' et la deadénylation de la queue polyA. Lorsque l'ARNm est dépourvu de ses régions non traduites, les exoribonucléases peuvent alors digérer le reste de l'ARNm. De façon intéressante, les protéines qui ont pour fonction de protéger la coiffe ou la queue polyA, comme eIF4E et PABP, se retrouvent dans les GS. En outre, de nombreuses protéines telles que Hur, SERBP1, MBNL1, LSM1, etc. (Annexe 1), impliquées dans la stabilité des ARNms se retrouvent dans les GS. Cependant, les facteurs qui favorisent l'enlèvement de la coiffe ou la deadénylation, tels que Dcp1a et PARN, sont situés dans les PBs et non dans les GS. Une explication possible pour la stabilisation de l'ARNm p21 à l'intérieur des GS serait alors l'isolement probable de celui-ci, par l'intermédiaire de CUGBP1, aux facteurs de déstabilisation. Sur ce, nos expériences préliminaires d'hybridation *in situ* avec des oligos dT démontrent que les ARNms qui sont séquestrés à l'intérieur des GS, lors du traitement de Bz, ne sont pas déadénylés et possèdent leurs queues polyA. Afin de vérifier que l'ARNm p21, spécifiquement, possède sa queue polyA à l'intérieur des GS, une expérience de FISH utilisant une sonde chevauchant la queue polyA et la séquence spécifique de l'ARNm p21 pourrait être utilisée.

Cependant, très récemment une étude est sortie et propose que les GS soient dispensables pour la stabilisation d'ARNms [152]. Ce dernier concept a premièrement été identifié chez la levure par le Dr Buchan

et le Dr Parker [42]. En retour, Bley et al. proposent que la stabilisation des ARNms testés, qui coïncide avec la formation des GS, soit principalement liée à la formation de mRNPs et non à la présence de ces mRNPs à l'intérieur des GS. Les auteurs affirment ceci en bloquant les protéines de liaison à l'ARN, TIA et G3BP, qui sont impliquées dans la formation des GS. Cette étude suggère que le rôle stabilisateur des GS peut être limité à certains ARNms spécifiques.

Mon hypothèse personnelle sur l'affirmation de Bley et al. est que ces mRNPs qui séquestrent les ARNms pourraient être les constituants fondamentaux, i.e. les noyaux, de futures GS. Par cela, je veux dire que les GS seraient des entités structurées et organisées composées d'un noyau et de différentes couches qui sont assemblées étape par étape de façon dynamique. Comme nous le savons, les GS sont dynamiques et possèdent une dynamique de formation unique qui dépend de nombreux aspects, dont celui du stress auquel les cellules sont soumises. Par conséquent, je le vois dans la façon que les mRNPs constituent la base de la GS à laquelle s'ajoute des couches supplémentaires, au cours de la période de formation de cette GS, afin de devenir une GS mature, et non pas comme des mRNPs qui migrent dans des GS pré existantes.

Les auteurs affirment que le blocage des protéines TIA1 et G3BP inhibe la formation de GS. Je crois que, selon mon système d'assemblage des GS, les protéines TIA1 et G3BP, comme d'autres protéines dynamiques, pourraient jouer un rôle dans les étapes finales de l'assemblage des GS en se localisant dans les couches externes de la GS. Cette localisation des protéines dans les couches externes de la granule pourrait alors permettre à ceux-ci de se déplacer librement entre le cytoplasme et la GS. En soutien à cette hypothèse, Bley et al. démontrent, à l'aide d'expériences de photoblanchiment (FRAP), que TIA1 et G3BP sont très dynamiques et se déplacent de façon continue entre la GS et le cytoplasme. L'expérience de FRAP consiste à blanchir par laser, la fluorescence qui est associée à la protéine d'étude, au niveau des GS, et de surveiller et enregistrer, par microscopie, le recouvrement de la fluorescence au niveau de la zone blanchit. Ce retour de fluorescence à l'intérieur de la GS indique un retour de cette protéine à l'intérieur de la GS et donc une dynamique de cette protéine entre le cytoplasme et la GS.

Par conséquent, je suggère que les constituants de base des GS pourraient être composés de mRNPs qui séquestrent des ARNms labiles et seraient déjà assemblés dans la première partie de la réponse au stress. Ces mRNPs pourraient alors être des GS qui sont à leurs premières étapes de formation et qui sont encore non détectables aux marqueurs de GS, puisque ces protéines observées en tant que marqueurs ne font pas encore partie de la GS. Le blocage de TIA et G3BP mettrait alors fin aux dernières étapes de formation des GS. Sur cette note, je voudrais partager une observation très intéressante que je fis, en parallèle à mes études, au cours de ma formation doctorale.

Maintenant, avec l'apparition d'outils en microscopie de plus en plus puissants, j'ai été en mesure d'observer des indices qui indiquent une certaine structure à l'intérieur des GS. Avec la technique d'immunofluorescence classique et la fonction de « z-stack » du microscope confocal Zeiss, j'ai pu identifier des couches distinctes de différentes RBP. Comme nous sommes habitués à un plan 2D et à fusionner les images (« merge ») pour la colocalisation de protéines, nous observons généralement que les GS sont jaunes dus à l'utilisation de fluorophores verts et rouges, si bien sûr les protéines d'études colocalisent. Toutefois, je fus surpris d'observer suite à un « z-stack » utilisant le marqueur de GS, FMRP, et une sonde à ARN pour détecter l'ARNm p21, une GS en forme de sphère extérieurement couverte seulement de FMRP. J'étais encore plus surprise de voir que l'ARNm p21, était situé seulement à l'intérieur. De plus, suite à un « z-stack » observant cette fois-ci la protéine CUGBP1 et l'ARNm p21, il fut possible de déterminer que CUGBP1 colocalisait parfaitement avec l'ARNm p21 de par l'homogénéité des fluorophores. Cette observation suggère une superposition de composants spécifiques de la GS et propose donc une certaine organisation structurale à l'intérieur des GS, tel que démontré dans le schéma suivant (Figure 4.4).

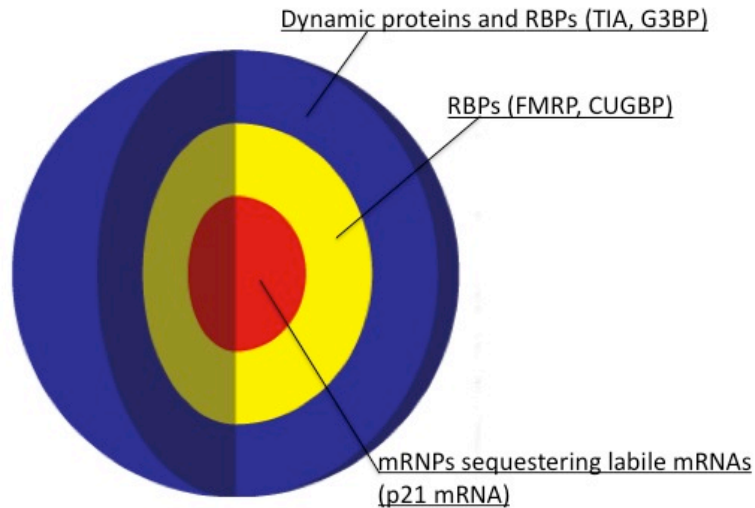


Figure 4-4 Schématisation hypothétique d'une structure des GS.

Je propose un concept dans lequel les GS seraient des structures organisées, assemblées par étapes sous une dynamique unique dépendante du stress. Je crois que les mRNPs qui séquestrent des ARNm labiles tels que l'ARNm p21 sont situés au centre de la granule ce qui facilite leur protection face à la dégradation. Certaines protéines de liaison à l'ARN, telles que FMRP et CUGBP1 pourraient alors être séquestrées autour des mRNPs pour leur permettre d'interagir avec ceux-ci. Finalement les protéines les plus dynamiques et qui sont impliquées dans plusieurs mécanismes de signalisations, dont les mécanismes de formation des GS, pourraient se retrouver dans la couche externe de la GS.

Cette observation pourrait ouvrir de nouvelles avenues sur par exemple: la dynamique de la GS, en décrivant la couche externe de la GS, qui peut potentiellement influencer ce qui peut entrer ou sortir de la GS. De plus, comme j'ai mentionné ici plus haut, ces différentes couches pourraient également nous renseigner sur une certaine dynamique de formation des GS.

En somme, notre étude suggère que l'accumulation de l'ARNm p21 est liée aux GS et sa libération via le désassemblage des GS, favorise la survie de la cellule cancéreuse. Maintenant, comment est-ce que l'ARNm p21 peut favoriser la survie cellulaire?

Tout d'abord, pour que l'ARNm p21 impose son effet anti-apoptotique, celui-ci doit être traduit. Nos études de polyribosomes démontrent que lors du désassemblage des GS, une fraction significative de CUGBP1

s'associe aux polyribosomes de traduction (résultats non présentés). Ceci suggère que CUGBP1, qui est relâché des GS, achemine son partenaire l'ARNm p21 aux polyribosomes pour sa traduction. L'expression de p21 est commune dans les tumeurs malignes humaines et corrèle positivement avec l'agressivité de certaines tumeurs [108], supportant ainsi le rôle pro-cancer de p21. Sur cette note, nos expériences préliminaires utilisant des cellules HeLa exprimant de façon stable un ShRNA contre p21, dans des essais de CAM, montrent que l'absence de p21 réduit de manière significative la croissance des tumeurs xénogreffes *in ovo*, suite au traitement de Bz (Annexe 2.4).

Notre première hypothèse quant à la manière que p21 inhibe l'apoptose, serait en arrêtant indirectement le cycle cellulaire et en promouvant la sénescence des cellules (voir introduction). Cependant, nos analyses FACS de la progression du cycle cellulaire révèlent que le Bz n'a aucune incidence sur le cycle cellulaire dans notre modèle (données non présentées). Ce dernier résultat rejette également la possibilité que p21 permet d'éviter l'apoptose par induction de la sénescence cellulaire. Curieusement, p21 se trouve à être accumulé temporairement dans le noyau après 10 heures de traitement de Bz et se déplace ensuite dans le cytoplasme après 16h de Bz (voir résultats). Dans les cellules cancéreuses de sein, l'accumulation de p21 dans le cytoplasme a démontré favoriser la survie cellulaire en inhibant les protéines liées à l'apoptose, telles que la procaspase 3, la caspase 8, la caspase 10, les protéines kinases activées par le stress (SAPK) et la kinase de régulation du signal d'apoptose (ASK1, également connue sous le nom de MAP3K5) [108]. ASK1 active la protéine kinase Jun-N-terminal en réponse à divers stress, y compris le stress d'inhibition du protéasome, entraînant ainsi l'apoptose [153,154,155]. Grâce à des expériences d'immunoprécipitations, nous avons mis en évidence une interaction entre p21 et ASK1 dans les conditions de Bz (résultats non publiés). Ce dernier résultat suggère que p21 pourrait inhiber l'apoptose en interagissant et en inactivant des facteurs pro-apoptotiques tels que ASK1 en réponse à l'inhibition du protéasome par le Bz.

En résumé nos études révèlent une voie anti-apoptotique p21-CUGBP1 unique qui implique la formation de GS, favorisant ainsi la résistance au Bz et ceci dans différentes lignées cellulaires cancéreuses primaires. Le ciblage des GS de manière directe, à travers l'inactivation de HRI, ou de manière indirecte par l'inactivation de l'interaction CUGBP1 / ARNm p21 en ciblant soit CUGBP1 ou p21, peut contribuer à sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes au Bz. Ainsi, le développement de composés thérapeutiques bloquant ces derniers facteurs devrait être pris en considération pour une thérapie combinatoire avec le Bz.

5. Conclusions et Perspectives

Mes travaux de recherche portant sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses m'ont permis de démontrer pour la première fois la formation des GS en réponse à un agent chimiothérapeutique, ici, le Bz. De cela nous décrivons une voie unique de par laquelle les GS influencent la réponse cellulaire face au traitement de Bz. Cette nouvelle voie met alors en évidence de nouveaux facteurs ayant un potentiel thérapeutique. En effet, la possibilité de cibler des facteurs responsables pour la formation des GS devrait être prise en compte. De plus, la caractérisation de cette nouvelle voie nous permet également de mieux comprendre les mécanismes d'actions et surtout les conséquences du traitement de Bz. Les mécanismes d'actions du Bz sont importants à savoir puisque le Bz est actuellement utilisé en clinique et présente des effets réfractaires sur certains types de cancers. Il existe maintenant d'autres inhibiteurs de protéasome qui sont actuellement utilisés en clinique. Nos études peuvent alors possiblement nous renseigner également sur la mécanistique de ces autres inhibiteurs de protéasome. Pour ceci, il sera important de creuser davantage la voie anti-apoptotique CUGBP1-p21 pour agrandir notre compréhension générale des mécanismes utilisés par le Bz et peut être identifié à nouveau d'autres facteurs impliqués dans le cancer. Voici alors quelques perspectives qui pourraient nous aider à décortiquer davantage notre modèle de chimiorésistance.

L'activation de HRI

Nos études préliminaires ont révélé que les ROS, et possiblement Hsp90, sont responsables en partie de l'activation de HRI. Sur ce, nous avons déterminé que les ROS sont importants pour la formation des GS, cependant, nous n'avons pas vérifié son implication dans la mort cellulaire face au Bz. Il serait alors intéressant de vérifier par analyses FACS si le NAC augmente la sensibilité des cellules cancéreuses au traitement de Bz et donc confirmer le rôle des ROS dans notre modèle de chimiorésistance. Comme il a déjà été mentionné, il serait nécessaire de vérifier l'implication de Hsp90 dans l'activation de HRI et donc dans la formation des GS en réponse au Bz. Pour ceci, des expériences de déplétion de Hsp90 à l'aide de 2 SiRNAs différents devront être faites.

CUGBP1

Afin de mieux comprendre comment CUGBP1 entraîne l'ARNm p21, il serait intéressant de vérifier s'il y a interaction directe ou indirecte entre l'ARNm p21 et CUGBP1. Pour déterminer ceci, d'autres analyses « gel shifts » devront être faites. Ensuite, afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la dynamique de CUGBP1 et donc son mouvement dans la cellule et son acheminement aux GS, il serait intéressant de vérifier si CUGBP1 est activé/phosphorylé lors du traitement de Bz. De manière intéressante, ceci impliquerait alors,

possiblement, des voies de signalisations dans notre modèle. Comme j'ai déjà mentionné, des expériences de mutagenèse et de déplétion, par SiRNAs, des kinases connues pour phosphoryler CUGBP1 pourront être faites. De plus, il serait également très intéressant de tester l'hypothèse de par laquelle CUGBP1 pourrait recruter l'ARNm p21 naissant, directement à son lieu de transcription dans le noyau de la cellule. Pour ceci, des expériences d'immunoprécipitation-chromatine avec analyse par électrophorèse (EMSA) pourraient être utilisées pour déterminer s'il y a interaction entre l'ADN du promoteur de p21 et la protéine CUGBP1 [156].

In vivo

Comme le démontrent Weniger et al., les mécanismes de réponse cellulaire face aux inhibiteurs de protéasome varient énormément entre le contexte *in vitro* et le contexte *in vivo*. Il sera alors important de vérifier notre modèle *in vitro* de chimiorésistance contre le Bz dans un modèle *in vivo*, par exemple à l'aide de tumeurs xéno greffes chez le modèle souris.

Mes études mettent alors en valeur une nouvelle voie anti-apoptotique qui pourrait être ciblée à plusieurs niveaux dans une thérapie combinatoire afin de diminuer les effets réfractaires du traitement principal étant le Bz. En somme, mes études ouvrent de nouvelles voies sur les possibilités de traitements contre le cancer.

6. Bibliographie

1. Anderson P, Kedersha N (2009) RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 430-436.
2. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T (2014) A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 15: 829-845.
3. Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, Wolozin B (2013) Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology* 59: 524-533.
4. Wolozin B (2012) Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 7: 56.
5. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, et al. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Human Molecular Genetics* 11: 3007-3017.
6. Wolozin B (2012) Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration* 7: 56.
7. Papatiantafyllou M (2012) Protein aggregation: The secret recipe for RNA granules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 405.
8. Erickson SL, Lykke-Andersen J (2011) Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J Cell Sci* 124: 293-297.
9. Anderson P, Kedersha N (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* 33: 141-150.
10. Buchan JR (2014) mRNP granules. *RNA Biol*: e29034.
11. Jain S, Parker R (2013) The discovery and analysis of P Bodies. *Adv Exp Med Biol* 768: 23-43.
12. Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I (2011) RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
13. Kiebler MA, Bassell GJ (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51: 685-690.
14. Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, et al. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160: 823-831.

15. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, et al. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular biology of the cell* 15: 5383-5398.
16. Reineke LC, Dougherty JD, Pierre P, Lloyd RE (2012) Large G3BP-induced granules trigger eIF2 α phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 23: 3499-3510.
17. Chapman RE, Walter P (1997) Translational attenuation mediated by an mRNA intron. *Curr Biol* 7: 850-859.
18. Graber TE, Hebert-Seropian S, Khoutorsky A, David A, Yewdell JW, et al. (2013) Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16205-16210.
19. Pimentel J, Boccaccio GL (2014) Translation and silencing in RNA granules: a tale of sand grains. *Front Mol Neurosci* 7: 68.
20. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* 147: 1431-1442.
21. Hofmann S, Cherkasova V, Bankhead P, Bukau B, Stoecklin G (2012) Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Mol Biol Cell* 23: 3786-3800.
22. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, et al. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Molecular biology of the cell* 13: 195-210.
23. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, et al. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* 151: 1257-1268.
24. Gardner LB (2008) Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Molecular and cellular biology* 28: 3729-3741.
25. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, et al. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 17: 4212-4219.

26. McInerney GM, Kedersha NL, Kaufman RJ, Anderson P, Liljeström P (2005) Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Molecular biology of the cell* 16: 3753-3763.
27. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW (2004) Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer cell* 5: 429-441.
28. Moutaoufik MT, El Fatimy R, Nassour H, Gareau C, Lang J, et al. (2014) UVC-induced stress granules in mammalian cells. *PloS one* 9: e112742.
29. Nover L, Scharf KD, Neumann D (1983) Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Molecular and cellular biology* 3: 1648-1655.
30. Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ (1988) Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Molecular and cellular biology* 8: 5059-5071.
31. Anderson P, Kedersha N (2002) Stressful initiations. *J Cell Sci* 115: 3227-3234.
32. Fraser CS, Doudna JA (2007) Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 5: 29-38.
33. Polunovsky VA, Bitterman PB (2006) The cap-dependent translation apparatus integrates and amplifies cancer pathways. *RNA Biol* 3: 10-17.
34. Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477-480.
35. Yanagiya A, Svitkin YV, Shibata S, Mikami S, Imataka H, et al. (2009) Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Mol Cell Biol* 29: 1661-1669.
36. Haghighat A, Sonenberg N (1997) eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J Biol Chem* 272: 21677-21680.
37. Marintchev A, Wagner G (2004) Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* 37: 197-284.
38. Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* 31: 553-562.

39. Anderson P, Kedersha N (2002) Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7: 213-221.
40. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, et al. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell* 17: 4212-4219.
41. Moka S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, et al. (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell* 20: 2673-2683.
42. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Molecular cell* 36: 932-941.
43. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, et al. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257-1268.
44. Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE (2007) Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell* 18: 2603-2618.
45. Tsai NP, Ho PC, Wei LN (2008) Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway. *EMBO J* 27: 715-726.
46. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, et al. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15: 5383-5398.
47. Lian XJ, Gallouzi IE (2009) Oxidative Stress Increases the Number of Stress Granules in Senescent Cells and Triggers a Rapid Decrease in p21waf1/cip1 Translation. *J Biol Chem* 284: 8877-8887.
48. Kim WJ, Back SH, Kim V, Ryu I, Jang SK (2005) Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol* 25: 2450-2462.
49. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M (2008) Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* 10: 1324-1332.
50. Eisinger-Mathason TS, Andrade J, Groehler AL, Clark DE, Muratore-Schroeder TL, et al. (2008) Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell* 31: 722-736.

51. Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, et al. (2013) Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol Cell Biol* 33: 815-829.
52. Damgaard CK, Lykke-Andersen J (2011) Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev* 25: 2057-2068.
53. Buchan JR, Muhlrad D, Parker R (2008) P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 183: 441-455.
54. Souquere S, Mollet S, Kress M, Dautry F, Pierron G, et al. (2009) Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci* 122: 3619-3626.
55. Kedersha N, Anderson P (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* 431: 61-81.
56. Bartoli KM, Bishop DL, Saunders WS (2011) The role of molecular microtubule motors and the microtubule cytoskeleton in stress granule dynamics. *Int J Cell Biol* 2011: 939848.
57. Fujimura K, Kano F, Murata M (2008) Dual localization of the RNA binding protein CUGBP-1 to stress granule and perinucleolar compartment. *Exp Cell Res* 314: 543-553.
58. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-884.
59. Guil S, Long JC, Caceres JF (2006) hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol* 26: 5744-5758.
60. Gareau C, Martel D, Coudert L, Mellaoui S, Mazroui R (2013) Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in *Drosophila*. *Biol Open* 2: 68-81.
61. van der Laan AM, van Gemert AM, Dirks RW, Noordermeer JN, Fradkin LG, et al. (2012) mRNA cycles through hypoxia-induced stress granules in live *Drosophila* embryonic muscles. *Int J Dev Biol* 56: 701-709.
62. Kwon S, Zhang Y, Matthias P (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev* 21: 3381-3394.
63. Bentmann E, Haass C, Dormann D (2013) Stress granules in neurodegeneration – lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS Journal* 280: 4348-4370.

64. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M (2008) Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol*.
65. Thedieck K, Holzwarth B, Prentzell MT, Boehlke C, Klasener K, et al. (2013) Inhibition of mTORC1 by Astrin and Stress Granules Prevents Apoptosis in Cancer Cells. *Cell* 154: 859-874.
66. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW (2004) Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5: 429-441.
67. Fournier MJ, Gareau C, Mazroui R (2010) The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int* 10: 12.
68. Kaehler C, Isensee J, Hucho T, Lehrach H, Krobitsch S (2014) 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res* 42: 6436-6447.
69. Morita T, Satoh R, Umeda N, Kita A, Sugiura R (2012) The stress granule protein Vgl1 and poly(A)-binding protein Pab1 are required for doxorubicin resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 399-403.
70. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
71. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
72. Vanneman M, Dranoff G (2012) Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 12: 237-251.
73. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE (2011) Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal* 5: 101-110.
74. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: 801-847.
75. Tanaka K, Mizushima T, Saeki Y (2012) The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem* 393: 217-234.
76. Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 19: 99-115.
77. Lu S, Wang J (2013) The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res* 1: 13.

78. Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17: 7151-7160.
79. Goldberg AL (2012) Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol* 199: 583-588.
80. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, et al. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761-771.
81. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, et al. (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59: 2615-2622.
82. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, et al. (2002) Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62: 4996-5000.
83. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J (1999) The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 5: 2638-2645.
84. Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, et al. (2002) Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 20: 4420-4427.
85. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, et al. (2003) A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 348: 2609-2617.
86. Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, et al. (2009) Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114: 1046-1052.
87. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. (2002) NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277: 16639-16647.
88. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP (2011) Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 11: 239-253.
89. Groll M, Berkers CR, Ploegh HL, Ovaas H (2006) Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* 14: 451-456.

90. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, et al. (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10: 609-618.
91. Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, van Meerloo J, Vojtekova K, et al. (2012) Impaired bortezomib binding to mutant beta5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia* 26: 757-768.
92. de Wilt LH, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Cloos J, et al. (2012) Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol* 83: 207-217.
93. Suzuki E, Demo S, Deu E, Keats J, Arastu-Kapur S, et al. (2011) Molecular mechanisms of bortezomib resistant adenocarcinoma cells. *PLoS One* 6: e27996.
94. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, et al. (2008) Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112: 2489-2499.
95. Ri M, Iida S, Nakashima T, Miyazaki H, Mori F, et al. (2010) Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress. *Leukemia* 24: 1506-1512.
96. Zang MR, Li F, An G, Xie ZQ, Li CH, et al. (2012) [Regulation of miRNA-15a/-16 expression on the drug resistance of myeloma cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92: 1100-1103.
97. Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, et al. (2012) Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 120: 3260-3270.
98. Waxman HS, Rabinovitz M (1965) Iron Supplementation in Vitro and the State of Aggregation and Function of Reticulocyte Ribosomes in Hemoglobin Synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 538-545.
99. Legon S, Jackson RJ, Hunt T (1973) Control of protein synthesis in reticulocyte lysates by haemin. *Nat New Biol* 241: 150-152.
100. Chen JJ (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* 109: 2693-2699.

101. Bauer BN, Rafie-Kolpin M, Lu L, Han A, Chen JJ (2001) Multiple autophosphorylation is essential for the formation of the active and stable homodimer of heme-regulated eIF2alpha kinase. *Biochemistry* 40: 11543-11551.
102. Igarashi J, Sasaki T, Kobayashi N, Yoshioka S, Matsushita M, et al. (2011) Autophosphorylation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase and the role of the modification in catalysis. *FEBS J* 278: 918-928.
103. Han AP, Yu C, Lu L, Fujiwara Y, Browne C, et al. (2001) Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J* 20: 6909-6918.
104. Han AP, Fleming MD, Chen JJ (2005) Heme-regulated eIF2alpha kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and beta-thalassemia. *J Clin Invest* 115: 1562-1570.
105. Berlanga JJ, Herrero S, de Haro C (1998) Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells. *J Biol Chem* 273: 32340-32346.
106. Mellor H, Flowers KM, Kimball SR, Jefferson LS (1994) Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase. Evidence for multitissue expression. *J Biol Chem* 269: 10201-10204.
107. Gareau C, Fournier MJ, Filion C, Coudert L, Martel D, et al. (2011) p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis. *PLoS one* 6: e20254.
108. Abbas T, Dutta A (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9: 400-414.
109. Adnane J, Jackson RJ, Nicosia SV, Cantor AB, Pledger WJ, et al. (2000) Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model. *Oncogene* 19: 5338-5347.
110. Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65: 3980-3985.
111. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL (1996) p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 213: 138-149.

112. Gartel AL, Tyner AL (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 246: 280-289.
113. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, et al. (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 18: 1223-1234.
114. Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, Dulic V (2003) Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J* 22: 3992-4002.
115. Gartel AL, Tyner AL (2002) The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1: 639-649.
116. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, et al. (1997) p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14: 929-935.
117. Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, et al. (2013) Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer* 109: 1876-1885.
118. Liu ZM, Chen GG, Ng EK, Leung WK, Sung JJ, et al. (2004) Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* 23: 503-513.
119. Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, Gibcus JH, van den Berg A, et al. (2010) Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest* 120: 3594-3605.
120. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, et al. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221.
121. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374: 386-388.
122. Luo Y, Hurwitz J, Massague J (1995) Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375: 159-161.
123. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665-679.
124. Gorospe M, Wang X, Holbrook NJ (1998) p53-dependent elevation of p21Waf1 expression by UV light is mediated through mRNA stabilization and involves a vanadate-sensitive regulatory system. *Mol Cell Biol* 18: 1400-1407.

125. Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, et al. (2000) HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20: 760-769.
126. Timchenko NA, Cai ZJ, Welm AL, Reddy S, Ashizawa T, et al. (2001) RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276: 7820-7826.
127. Paillard L, Omilli F, Legagneux V, Bassez T, Maniey D, et al. (1998) EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *The EMBO journal* 17: 278-287.
128. Cardani R, Bugiardini E, Renna LV, Rossi G, Colombo G, et al. (2013) Overexpression of CUGBP1 in Skeletal Muscle from Adult Classic Myotonic Dystrophy Type 1 but Not from Myotonic Dystrophy Type 2. *PloS one* 8: e83777.
129. Kress C, Gautier-Courteille C, Osborne HB, Babinet C, Paillard L (2007) Inactivation of CUG-BP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol Cell Biol* 27: 1146-1157.
130. Lee JE, Lee JY, Wilusz J, Tian B, Wilusz CJ (2010) Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PloS one* 5: e11201.
131. Rattenbacher B, Beisang D, Wiesner DL, Jeschke JC, von Hohenberg M, et al. (2010) Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol Cell Biol* 30: 3970-3980.
132. Timchenko NA, Welm AL, Lu X, Timchenko LT (1999) CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 27: 4517-4525.
133. Welm AL, Mackey SL, Timchenko LT, Darlington GJ, Timchenko NA (2000) Translational induction of liver-enriched transcriptional inhibitory protein during acute phase response leads to repression of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA. *J Biol Chem* 275: 27406-27413.
134. Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT (2001) Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 21: 6927-6938.
135. Salisbury E, Sakai K, Schoser B, Huichalaf C, Schneider-Gold C, et al. (2008) Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp Cell Res* 314: 2266-2278.

136. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M (2008) Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* 10: 1324-1332.
137. Kwon S, Zhang Y, Matthias P (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes & development* 21: 3381-3394.
138. Lu L, Han AP, Chen JJ (2001) Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Molecular and cellular biology* 21: 7971-7980.
139. Uma S, Hartson SD, Chen JJ, Matts RL (1997) Hsp90 is obligatory for the heme-regulated eIF-2 α kinase to acquire and maintain an activable conformation. *J Biol Chem* 272: 11648-11656.
140. Thulasiraman V, Xu Z, Uma S, Gu Y, Chen JJ, et al. (1998) Evidence that Hsc70 negatively modulates the activation of the heme-regulated eIF-2 α kinase in rabbit reticulocyte lysate. *Eur J Biochem* 255: 552-562.
141. Uma S, Thulasiraman V, Matts RL (1999) Dual role for Hsc70 in the biogenesis and regulation of the heme-regulated kinase of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 19: 5861-5871.
142. Miyata Y (2005) Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Des* 11: 1131-1138.
143. Szatrowski TP, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51: 794-798.
144. Storz P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10: 1881-1896.
145. Weniger MA, Rizzatti EG, Perez-Galan P, Liu D, Wang Q, et al. (2011) Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 17: 5101-5112.
146. Harvey RD, Nettles J, Wang B, Sun SY, Lonial S (2009) Commentary on Perrone et al.: 'vitamin C: not for breakfast anymore...if you have myeloma'. *Leukemia* 23: 1939-1940.
147. Chen T, Ozel D, Qiao Y, Harbinski F, Chen L, et al. (2011) Chemical genetics identify eIF2 α kinase heme-regulated inhibitor as an anticancer target. *Nat Chem Biol* 7: 610-616.

148. Yamada H, Yamada E, Kwak N, Ando A, Suzuki A, et al. (2000) Cell injury unmasks a latent proangiogenic phenotype in mice with increased expression of FGF2 in the retina. *J Cell Physiol* 185: 135-142.
149. Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J (2006) CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA* 12: 1084-1091.
150. Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, et al. (2004) Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J* 23: 406-417.
151. Zid BM, O'Shea EK (2014) Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature* 514: 117-121.
152. Bley N, Lederer M, Pfalz B, Reinke C, Fuchs T, et al. (2015) Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic Acids Res* 43: e26.
153. Gabai VL, Sherman MY (2002) Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* (1985) 92: 1743-1748.
154. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY (1998) Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 273: 6373-6379.
155. Seomun Y, Kim JT, Kim HS, Park JY, Joo CK (2005) Induction of p21Cip1-mediated G2/M arrest in H₂O₂-treated lens epithelial cells. *Mol Vis* 11: 764-774.
156. Perez-Romero P, Imperiale MJ (2007) Assaying protein-DNA interactions in vivo and in vitro using chromatin immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assays. *Methods Mol Med* 131: 123-139.

Annexes

Annexe 1 Tableau du contenu des Granules de Stress

Ce tableau a été tiré de l'article «Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation », fait par le Dr Buchan J.R. et le Dr Parker R., publié dans Molecular Cell en 2009.

Factor	Properties	References
40S	Small subunit of ribosomes	Kedersha et al, 2002; Grousl et al, 2009
Ago2	miRNA silencing; siRNA cleavage	Leung et al, 2006
AKAP350	Cell signaling scaffold; centrosome/golgi associated	Kolobova et al,2009
APOBEC3G	Antiviral factor	Gallois-Montbrun et al, 2007
Ataxin-2/Pbp1	Ataxin-2: regulates SG/PB assembly; Implicated in Spinocerebellar ataxia 2 Pbp1: poly(A)tail processing; splicing;export; translational regulator; SG assembly	Nonhoff et al, 2007; Buchan et al, 2008
BRF1	mRNA decay	Kedersha et al, 2005
Calreticulin	ER Chaperone; RNA binding protein	Decca et al, 2007
Caprin1	Associated with cell cycle proliferation; RNA binding protein;nucleates SGs	Solomon et al, 2007
CCAR1	Apoptosis regulator; DNA/RNA binding protein	Kolobova et al, 2009
CIRP	Translational regulator; nucleates SGs	De Leeuw et al, 2007
CPEB	Translational regulator; nucleates SGs	Wilczynska et al, 2005
CUGBP1	mRNA splicing; translational regulator; mRNA stability; Implicated in myotonic dystrophy	Fujimura et al, 2007
Dcp1/Dcp1a	mRNA decay (decapping)	Sheth et al, 2003; Cougot et al, 2004; Wilczynska et al, 2005
DDX1	RNA helicase;3'end formation	Ishiura et al, 2008
DDX3/Ded1	RNA helicase; translational regulator; mRNA export	Lai et al, 2008; Beckman et al, 2007
DIC1/DHC1	Dynein Intermediate chain/Dynein Heavy chain	Loschi et al, 2009
DIS1	Implicated in Schizophrenia; nucleates SGs	Ogawa et al, 2005
eIF2	Initiation factor; recruits initiator tRNA	Kimbal et al, 2003

eIF2B	Guanine exchange factor for eIF2	Kimbal et al, 2003
eIF3	Multi-subunit initiation factor	Kedersha et al, 2002; Grousl et al, 2009
eIF4A	RNA helicase; eIF4F initiation factor	Kedersha et al, 2000
eIF4E	Cap binding protein; eIF4F initiation factor	Kedersha et al, 2002; Hoyle et al, 2007
eIF4G	eIF4F scaffold; initiation factor	Kedersha et al, 2002; Hoyle et al, 2007
FAK	Kinase; phosphorylates Grb7	Tsai et al, 2008
FAST	Kinase; splicing; anti-apoptotic regulator	Kedersha et al, 2005
FBP/KSRP	mRNA decay	Rothe et al, 2006
FMRP	Translational regulator; nucleates SGs; implicated in Fragile-X syndrome	Mazroui et al, 2002
FXR1P	Translational regulator	Mazroui et al, 2002
FXR2P	Translational regulator	Mazroui et al, 2002
G3BP	Ras signaling; SG assembly; endonuclease	Tourriere et al, 2003
Grb7	Translational regulator; nucleates SGs; SG disassembly role	Tsai et al, 2008
hMex3B	Translational regulator	Courchet et al, 2008
hnRNP A1	Splicing; export; translational regulator; mRNA stability	Guil et al, 2006
hnRNP k	Chromatin remodeling; transcription; splicing; export; translational regulator; mRNA stability	Fukuda et al, 2009
hnRNP Q	Splicing; export; translational regulator; mRNA stability	Quaresma et al, 2009
Hsp27	Heat shock protein	Kedersha et al, 1999
HuD	mRNA stability	Burry and Smith, 2006
HuR	mRNA stability; splicing regulator; poly(A) site selection	Gallouzi et al, 2000
IP5K	Generates InsP6	Brehm et al, 2007
Importin-8	Importin	Weinmann et al, 2009
KHC/KLC	Kinesin Heavy Chain/Kinesin Light Chain	Loschi et al, 2009
Lin28	Translational regulator	Balzer and Moss, 2007; Polesskaya et al, 2007
LINE1/ORF1p	Transposon protein	Goodier et al, 2007
MBNL1	Splicing; mRNA stability; Implicated in myotonic dystrophy	Ishiura et al, 2008
MEX67	Major mRNA export factor	Lai et al, 2008
MLN51	Exon-Junction complex component (splicing)	Baguet et al, 2007
Musashi	Translational regulator	Kawahara et al, 2008
NXF7	Cytoplasmic mRNA transport	Katahira et al, 2008

p97/NAT1	eIF4G homolog; translational regulator	Nousch et al, 2007
PABP/Pab1	Poly(A) binding protein; stimulates translation; mRNA stability	Kedersha et al, 1999; Hoyle et al, 2007
PCBP2	Stimulates IRES translation	Fujimura et al, 2008
Plakophilin 1/3	Cell-Cell adhesion	Hoffman et al, 2006
Prohibitin 2	Mitochondrial apoptosis regulator	Ohn et al, 2008
PRTB	Translational regulator; nucleates SGs	Kim et al, 2008
Pum1	Cytoplasmic RNA binding protein	Morris et al, 2008
Pum2	Translational regulator; nucleates SGs	Vessey et al, 2006
RACK1	Cell signaling scaffold protein; apoptotic regulator	Arimoto et al, 2008
RBM42	Nuclear mRNA binding protein	Fukuda et al, 2009
Rap55/Scd6	PB assembly role	Yang et al, 2006; Barbee et al, 2006
RCK/Dhh1	RNA helicase; translational regulator	Wilczynska et al, Sheth et al, 2003
RHAU	RNA helicase; mRNA stability	Chalupnikova et al, 2008
Roquin	mRNA stability	Vinuesa et al, 2005; Yu et al, 2007
RSK2	Ribosomal S6 kinase; anti-apoptotic regulator	Eisinger-Mathason et al, 2008
Sam68	Translational regulator	Henano-Mejia and He, 2009
SERBP1	mRNA stability	Goullet et al, 2008
SGNP	Putative rRNA processing factor	Zhu et al, 2008
Smaug 1	Translational regulator	Baez and Boccaccio, 2005
Staufen	Translational regulator	Thomas et al, 2005
SMN	snRNP assembly	Bechade et al, 1999; Hua and Zhou, 2004; Liu and Gall, 2007
TDP-43	DNA/RNA binding; splicing regulator; mRNA transport	Colombrita et al, 2009
TDRD3	Tudor/Ub-binding protein	Goullet et al, 2008
TIA-1/Pub1	TIA-1: Translational regulator; nucleates SGs; SG assembly factor; splicing regulator Pub1: mRNA stability; SG assembly	Kedersha et al, 1999; Buchan et al, 2008
TIA-R/Ngr1	TIA-R: Translational regulator; nucleates SGs; splicing regulator Ngr1: mRNA stability	Kedersha et al, 1999; Buchan et al, 2008
TRAF2	TNFalpha signaling	Kim et al, 2005
TTP	mRNA decay	Stoecklin et al, 2004; Kedersha et al, 2005
Xrn1	5'-3' exoribonuclease	Kedersha et al, 2005
YB-1	RNA/DNA binding protein; transcriptional regulator; splicing; translational regulator; mRNA stability	Yang and Bloch, 2007; Ishiura et al, 2008

ZBP1	Translational repressor; mRNA stability	Stohr et al, 2006
------	---	-------------------

Annexe 2 Publications

Annexe 2.1 Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in Drosophila

Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in Drosophila

Cristina Gareau, David Martel, Laetitia Coudert, Samia Mellaoui and Rachid Mazroui*

Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry, and Pathology, Faculty of Medicine, Laval University, CHUQ Research Center/St-François d'Assise Research Center, Quebec, QC G1L 3L5, Canada

*Author for correspondence (rachid.mazroui@crsfa.ulaval.ca)

Biology Open 2, 68–81 doi: 10.1242/bio.20123012

Received 31st August 2012 ; Accepted 3rd October 2012

Abstract :

FMRP is an evolutionarily conserved protein that is highly expressed in neurons and its deficiency causes fragile X mental retardation syndrome. FMRP controls the translation of target mRNAs in part by promoting their dynamic transport in neuronal RNA granules. We have previously shown that high expression of mammalian FMRP induces formation of granules termed FMRP granules. These RNA granules are reminiscent of neuronal granules, of stress granules, as well as of the recently described in vitro-assembled granules. In contrast with mammalian FMRP, which has two paralog proteins, Drosophila FMRP (dFMRP) is encoded by a single gene that has no paralog. Using this genetically simple organism, we investigated formation and dynamics of FMRP granules. We found that increased expression of dFMRP in Drosophila cells induces the formation of dynamic dFMRP RNA granules. Mutagenesis studies identified the N-terminal protein-protein domain of dFMRP as a key determinant for FMRP granules formation. The RGG RNA binding motif of dFMRP is dispensable for dFMRP granules formation since its deletion does not prevent formation of those granules. Deletion of the RGG motif reduced, however, dFMRP trafficking between FMRP granules and the cytosol. Similarly, deletion of a large part of the KH RNA binding motif of dFMRP had no effect on formation of dFMRP-granules, but diminished the shuttling activity of dFMRP. Our results thus suggest that the mechanisms controlling formation of RNA granules and those promoting their dynamics are uncoupled. This

study opens new avenues to further elucidate the molecular mechanisms controlling FMRP trafficking with its associated mRNAs in and out of RNA granules.

Annexe 2.2 Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein Recruitment and Dynamics in *Drosophila* Stress Granules

Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein Recruitment and Dynamics in *Drosophila* Stress Granules

Cristina Gareau, Elise Houssin, David Martel, Laetitia Coudert, Samia Mellaoui, Marc-Etienne Huot, Patrick Laprise, Rachid Mazroui*

Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry, and Pathology, Faculty of Medicine, Laval University, Centre de recherche le CHU de Quebec, Quebec, Canada

PLoS ONE 8(2): e55342. doi:10.1371/journal.pone.0055342

Received September 4, 2012; Accepted December 21, 2012; Published February 7, 2013

Abstract:

The RNA-binding protein Fragile X Mental Retardation (FMRP) is an evolutionarily conserved protein that is particularly abundant in the brain due to its high expression in neurons. FMRP deficiency causes fragile X mental retardation syndrome. In neurons, FMRP controls the translation of target mRNAs in part by promoting dynamic transport in and out neuronal RNA granules. We and others have previously shown that upon stress, mammalian FMRP dissociates from translating polysomes to localize into neuronal-like granules termed stress granules (SG). This localization of FMRP in SG is conserved in *Drosophila*. Whether FMRP plays a key role in SG formation, how FMRP is recruited into SG, and whether its association with SG is dynamic are currently unknown. In contrast with mammalian FMRP, which has two paralog proteins, *Drosophila* FMR1 (dFMRP) is encoded by a single gene that has no paralog. Using this genetically simple model, we assessed the role of dFMRP in SG formation and defined the determinants required for its recruitment in SG as well as its dynamics in SG. We show that dFMRP is dispensable for SG formation *in vitro* and *ex vivo*. FRAP experiments showed that dFMRP shuttles in and out SG. The shuttling activity of dFMRP is mediated by a protein-protein interaction domain located at the N-terminus of the protein. This domain is, however, dispensable for the localization of dFMRP in SG. This localization of dFMRP in SG requires the KH and RGG motifs which are known to mediate RNA binding, as well as the C-terminal glutamine/asparagine rich domain.

Our studies thus suggest that the mechanisms controlling the recruitment of FMRP into SG and those that promote its shuttling between granules and the cytosol are uncoupled. To our knowledge, this is the first demonstration of the regulated shuttling activity of a SG component between RNA granules and the cytosol.

Annexe 2.3 Direct binding of the *Alu* binding protein dimer SRP9/14 to 40S ribosomal subunits promotes stress granule formation and is regulated by *Alu* RNA

Direct binding of the *Alu* binding protein dimer SRP9/14 to 40S ribosomal subunits promotes stress granule formation and is regulated by *Alu* RNA

A. Berger¹, E. Ivanova¹, C. Gareau², A. Scherrer¹, R. Mazroui² and K. Strub^{1,*}

(1) Department of Cell Biology, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland and (2) Département de biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie Université Laval, Québec G1V0A6, Canada

Nucleic Acids Res. 2014;42(17):11203-17. doi: 10.1093/nar/gku822. Epub 2014 Sep 8.

Received December 4, 2013; Revised August 27, 2014; Accepted August 29, 2014

Abstract:

Stress granules (SGs) are formed in response to stress, contain mRNAs, 40S ribosomal subunits, initiation factors, RNA-binding and signaling proteins, and promote cell survival. Our study describes a novel function of the protein heterodimer SRP9/14 and *Alu* RNA in SG formation and disassembly. In human cells, SRP9/14 exists assembled into SRP, bound to *Alu* RNA and as a free protein. SRP9/14, but not SRP, localizes to SGs following arsenite or hippuristanol treatment. Depletion of the protein decreases SG size and the number of SG-positive cells. Localization and function of SRP9/14 in SGs depend primarily on its ability to bind directly to the 40S subunit. Binding of SRP9/14 to 40S and *Alu* RNA is mutually exclusive indicating that the protein alone is bound to 40S in SGs and that *Alu* RNA might competitively regulate 40S binding. Indeed, by changing the effective *Alu* RNA concentration in the cell or by expressing an *Alu* RNA binding-defective protein we were able to influence SG formation and disassembly. Our findings suggest a model in which SRP9/14 binding to 40S promotes SG formation whereas the increase in cytoplasmic *Alu* RNA following stress promotes disassembly of SGs by disengaging SRP9/14 from 40S.

Annexe 2.4 Inactivation of the mTORC1-Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Pathway Alters Stress Granule Formation

Inactivation of the mTORC1-Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Pathway Alters Stress Granule Formation

Marie-Josée Fournier, (a) Laetitia Coudert, (a) Samia Mellaoui, (a) Pauline Adjibade, (a) Cristina Gareau, (b) Marie-France Côté, (c) Nahum Sonenberg, (b) René C. Gaudreault, (a) Rachid Mazroui

Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry, and Pathology (a) and Department of Molecular Medicine (b), Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Quebec Research Center, Quebec (QC), Canada; Department of Biochemistry, McGill University, Montreal (QC), Canada (c)

Mol Cell Biol. 2013 Jun;33(11):2285-301. doi: 10.1128/MCB.01517-12. Epub 2013 Apr 1.

Received 12 November 2012; Returned for modification 19 December 2012; Accepted 20 March 2013

Abstract:

Stress granules (SG) are cytoplasmic multimeric RNA bodies that form under stress conditions known to inhibit cap-dependent translation. SG contain translation initiation factors, RNA binding proteins, and signaling molecules. SG are known to inhibit apoptotic pathways, thus contributing to chemo- and radioresistance in tumor cells. However, whether stress granule formation involves oncogenic signaling pathways is currently unknown. Here, we report a novel role of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) pathway, a key regulator of cap-dependent translation initiation of oncogenic factors, in SG formation. mTORC1 specifically drives the eIF4E-mediated formation of SG through the phosphorylation of 4E-BP1, a key factor known to inhibit formation of the mTORC1-dependent eIF4E-eIF4GI interactions. Disrupting formation of SG by inactivation of mTOR with its specific inhibitor pp242 or by depletion of eIF4E or eIF4GI blocks the SG-associated antiapoptotic p21 pathway. Finally, pp242 sensitizes cancer cells to death *in vitro* and inhibits the growth of chemoresistant tumors *in vivo*. This work therefore highlights a novel role of the oncogenic mTORC1-eIF4E pathway, namely, the promotion of formation of antiapoptotic SG.

Annexe 2.5 UVC-Induced Stress Granules in Mammalian Cells

UVC-Induced Stress Granules in Mammalian Cells

Mohamed Taha Moutaoufik¹, Rachid El Fatimy¹, Hassan Nassour², Cristina Gareau², Jérôme Lang¹,

Robert M. Tanguay³, Rachid Mazroui², Edouard W. Khandjian^{1*}

(1) Centre de recherche, Institut universitaire en santé mentale de Québec, Département de psychiatrie et de neurosciences, Université Laval, Québec, PQ, Canada, (2) Centre de recherche du CHU de Québec. Département de biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie, Université Laval, Québec, PQ, Canada, (3) Laboratoire de génétique cellulaire et du développement, Département de biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie, Université Laval, Québec, PQ, Canada

PLoS ONE 9(11): e112742. doi:10.1371/journal.pone.0112742

Received May 9, 2014; Accepted October 14, 2014; Published November 19, 2014

Abstract :

Stress granules (SGs) are well characterized cytoplasmic RNA bodies that form under various stress conditions. We have observed that exposure of mammalian cells in culture to low doses of UVC induces the formation of discrete cytoplasmic RNA granules that were detected by immunofluorescence staining using antibodies to RNA-binding proteins. UVC-induced cytoplasmic granules are not Processing Bodies (P-bodies) and are bone fide SGs as they contain TIA-1, TIA-1/R, Caprin1, FMRP, G3BP1, PABP1, well known markers, and mRNA. Concomitant with the accumulation of the granules in the cytoplasm, cells enter a quiescent state, as they are arrested in G1 phase of the cell cycle in order to repair DNA damages induced by UVC irradiation. This blockage persists as long as the granules are present. A tight correlation between their decay and re-entry into S-phase was observed. However the kinetics of their formation, their low number per cell, their absence of fusion into larger granules, their persistence over 48 hours and their slow decay, all differ from classical SGs induced by arsenite or heat treatment. The induction of these SGs does not correlate with major translation inhibition nor with phosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α). We propose that a restricted subset of mRNAs coding for proteins implicated in cell cycling are removed from the translational apparatus and are sequestered in a repressed form in SGs.