



**LA FORMATION DES GRANULES DE STRESS
UN POSSIBLE MECANISME GENERAL DE LA REPONSE DES
CELLULES CANCEREUSES AUX DROGUES ANTI-CANCERS**

Thèse

Laëtitia Coudert

Doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© LAËTITIA COUDERT, 2014

Résumé

Le réflexe naturel d'une cellule eucaryote, soumise à un stress (ex : radiations, drogues anti-cancereuses...), est d'activer des mécanismes de défense afin de s'adapter aux conditions extrêmes imposées, leur permettant de survivre. Un des mécanismes activé en condition de stress est l'inhibition de l'initiation de la traduction menant à la formation de granules de stress (GS). Les GS sont des corps cytoplasmiques dynamiques renfermant des facteurs d'initiation de la traduction, des ARNms, des protéines de liaison à l'ARN ainsi que des molécules de signalisation impliquées dans les voies de mort cellulaire. La formation des GS fut identifiée comme un évènement clé inactivant les voies de mort cellulaire, constituant donc un mécanisme majeur de survie, qui dans le cas du cancer peut engendrer une chimiorésistance. Nous avons précédemment conduit un criblage des facteurs d'initiations de la traduction impliqués dans la formation des GS. Ces travaux (Mazroui et al, 2006 ; Mokaš et al, 2009) ont permis d'identifier plusieurs facteurs dont l'inactivation induit la formation des GS. Par contre, l'inactivation du facteur eIF4E, qui est responsable de la reconnaissance des ARNms lors de l'initiation de la traduction, n'induit pas la formation des GS.

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence un nouveau rôle du facteur d'initiation de la traduction eIF4E ainsi que son partenaire eIF4G1 dans la formation des GS induites par le traitement chimiothérapeutique Bortezomib. Ce rôle est stimulé par la voie oncogénique mTORC1, qui est la voie de signalisation responsable de l'interaction eIF4E-eIF4G1. De plus, notre étude a démontré que l'inhibition spécifique d'eIF4E, d'eIF4G1 ou l'inactivation de mTORC1 empêche l'activation des voies anti-apoptotiques associées au GS, sensibilisant ainsi les cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. Néanmoins, la formation des GS n'est pas restreinte au Bortezomib. En effet, notre criblage des drogues chimiothérapeutiques a identifié le Sorafenib (Nexavar®) et le Lapatinib (Tykerb/Tyverb®) comme deux puissants inducteurs des GS au sein des cellules cancéreuses. En conclusion, ces travaux ont mis en lumière un nouveau mécanisme de formation des GS ainsi que deux potentiels inducteurs d'assemblage de ces granules.

Abstract

The natural reflex of a eukaryotic cell under stress (e.g.: radiation, anti-cancer drugs, thermal or oxidative stress) is to activate defense mechanisms to adapt to extreme conditions imposed, allowing them to survive. One mechanism activated under stress conditions is the inhibition of translation initiation leading to the formation of stress granules (SG). SG are dynamic cytoplasmic body containing translation initiation factors, mRNAs, RNA binding proteins and signaling molecules involved in cell death pathways. SG formation was identified as a key event inactivating cell death pathways, thus establishing a major survival mechanism, which in the case of cancer can lead to drug resistance.

We previously conducted a screening of the translation initiation factors involved in the SG formation. These works (Mazroui et al, 2006; Mochas et al, 2009) have identified several factors that inactivation induces the formation of GS. For cons, the inactivation of factor eIF4E, which is responsible for the recognition of mRNAs during translation initiation, does not induce the formation of SG. My thesis has highlighted a new role for the translation initiation factors eIF4E and its partner eIF4GI in the SG formation induced by chemotherapeutic drug Bortezomib. This role is stimulated by oncogenic mTORC1 pathway, which is the key regulator of the eIF4E-eIF4GI interaction. In addition, our study demonstrated that specific inhibition of eIF4E, eIF4GI or the inactivation of mTORC1 prevents anti-apoptotic pathways associated with SG and sensitizing cancer cells to chemotherapeutic treatments.

The SG formation is not restricted to Bortezomib. Indeed, our screening of chemotherapeutic drugs has identified Sorafenib (Nevaxar ®) and Lapatinib (Tykerb / Tyverb ®) as two potent inducers of SG in cancer cells. Our results indicate that the mechanism of action of these two drugs appears to be similar to Bortezomib and they induce the formation of SG by inhibiting translation initiation. In addition, the formation of SG induced by Sorafenib or Lapatinib also seems to depend on the eIF4E-eIF4GI complex formation. Therefore, my work provides a general role of eIF4E-eIF4GI interaction in the assembly of SG and the cancer cells resistance to chemotherapy.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xix
Avant-propos	xxiii
CHAPITRE 1. Introduction générale au Cancer et à la réponse au Stress	1
1. GÉNÉRALITÉS	2
1.1. La cellule eucaryote et ses constituants	2
1.2. De l'ADN à la protéine	2
1.3. Division et Cycle cellulaire	4
2. LE CANCER	6
2.1. Quelques généralités	6
2.1.1. Historique et Statistique	6
2.1.2. Les étapes de développement du cancer	6
2.2. Le Cancer, une transformation cellulaire progressive et évolutive	7
2.2.1. La génétique moléculaire du cancer	7
2.2.2. Les « Hallmarks » du Cancer	8

2.3. Les Thérapies anti-cancers	10
2.3.1. Chimiothérapie	11
2.4. Le système Protéasome, Bortezomib et Cancer	12
2.4.1. Le protéasome	13
2.4.2. Rôle du protéasome dans la régulation de diverses fonctions cellulaires	15
2.4.3. Le Bortezomib (VELCADE ®)	16
2.4.4. Structure du Bortezomib	17
2.4.5. Mécanisme moléculaire d'action du Bortezomib	17
2.4.6. Des cas de résistance au Bortezomib	19
2.5. Sorafenib, Lapatinib et Contexte de la Découverte	20
2.5.1. Vers la découverte et le développement de Sorafenib	20
2.5.2. Mécanisme d'action et Cibles cellulaires du Sorafenib	21
2.5.3. L'activité anti-tumorale in vitro et modèle animal	21
2.5.4. Des cas de résistance	22
2.5.5. Vers un lien avec les granules de stress?	23
2.6. Lapatinib	24
2.6.1. Vers la découverte et le développement de Lapatinib	24
2.6.2. Cibles cellulaires de Lapatinib et Mécanisme d'Action	24

2.6.3. Activité anti-tumorale	25
2.6.4. Des cas de résistance	26
2.6.5. Vers un lien avec les GS?	27
3. TRADUCTION & CANCER	29
3.1. L'initiation de la traduction : Généralités	29
3.2. Mécanisme de l'initiation de la traduction	30
3.2.1. Formation du complexe ternaire et du complexe de pré-initiation 43S	30
3.2.2. Formation du complexe de pré-initiation 48S	32
3.2.3. Formation du ribosome fonctionnel 80S	34
3.4. La kinase HRI	36
3.4.1. Structure d'HRI	36
3.4.2. Etats d'activation de la Kinase HRI	37
3.4.3. Fonctions connues d'HRI	38
3.5. Acteurs clés de l'initiation de la traduction	40
3.5.1. Le facteur eIF4E	40
3.5.2. Le facteur 4E-BP1	46
3.5.3. Le facteur eIF4GI	50
3.5.4. La kinase mTOR : les acteurs principaux, activation et régulation	52

4. LES GRANULES DE STRESS	58
4.1. Un phénomène inter-espèces évolutif	58
4.2. Quelques inducteurs de granules de stress	59
4.3. Caractéristiques principales des GS	60
4.4. Constituants principaux des GS	62
4.4.1. Généralités	62
4.4.2. ARNm	62
4.4.3. Protéines de liaison à l'ARN	65
4.4.4. Molécules de signalisation associées à la mort cellulaire	65
4.4.5. Protéines associées à la neurodégénération cellulaire	66
4.5. Les mécanismes de formation des GS connus à ce jour	66
4.5.1. Assemblage des GS dépendant de la phosphorylation du facteur eIF2 α	67
4.5.2. Assemblage des GS dépendant des autres facteurs d'initiation de la traduction	68
4.6. Désassemblage des GS	70
4.7. Les rôles connus des GS	71
4.7.1. Au niveau de la traduction	71
4.7.2. Au niveau de la stabilisation de certains ARNm	72
4.7.3. GS et pathologies: quels liens?	75
CHAPITRE 2. Contexte et Objectifs de cette thèse	83

2.1. Contexte de la recherche	83
2.2. Objectif général	83
2.3. Objectifs spécifiques	84
CHAPITRE 3. Matériels et Méthodes	85
CHAPITRE 4. Résultats	99
Partie 1. Nouveau rôle de la voie oncogénique mTOR-eIF4E dans la formation des granules de stress et la résistance cellulaire cancéreuse associée	99
1.1. Résumé	102
1.2. Abstract	102
1.3. Introduction	103
1.4. Materials and methods	106
1.5. Results	111
1.6. Discussion	142
1.7. Acknowledgments	147
1.8. Footnotes	147
1.9. References	148
1.10. Supplementary materials	156
Partie 2. Sorafenib et Lapatinib, deux agents chimiothérapeutiques capables d'induire la formation des granules de stress	168
1. Criblage d'une librairie de drogues anti-cancer approuvées par le Food and Drug Administration	169
1.1. La Démarche expérimentale	169
1.2. De nouvelles drogues chimiothérapeutiques capable d'induire la formation des GS	171

1.2.1. Le Sorafenib	171
1.2.2. Le Celecoxib	172
1.2.3. Le Lapatinib	173
2. Le Celecoxib induit la formation des GS et l'inhibition de la traduction	176
3. L'agent chimiothérapeutique Sorafenib induit la formation des GS au sein des cellules d'hépatocarcinomes.	178
3.1. Assemblage des GS en réponse au Sorafenib	178
3.2. Inhibition de l'initiation de la Traduction en réponse au Sorafenib	180
3.3. Mécanisme(s) de formation des GS induites par Sorafenib	182
3.4. La formation des GS s'associe à une résistance des cellules au Sorafenib	183
4. L'agent chimiothérapeutique Lapatinib induit la formation des GS	186
4.1. Assemblage des GS en réponse au Lapatinib	186
4.2. Inhibition de l'initiation de la Traduction en réponse au Lapatinib	188
4.3. Mécanisme(s) de formation des GS induites par Lapatinib	190
4.4. La formation des GS s'associent à une résistance des cellules au Lapatinib	190
Partie 3. Rôle (s) de la kinase de stress HRI lors du fonctionnement cellulaire normal et lors de la réponse cellulaire au stress chimiothérapeutique	193
1. Contexte du Projet	193
1.1 Objectif de cette étude exploratoire	194

2. HRI, régulateur de l'expression génique en condition de stress chimiothérapeutique	194
2.1. Démarche expérimentale et analytique	194
2.2. Profils d'expression génique dans les HeLa shNE et shHRI soumises au Bortezomib	199
2.2.1. Les conditions expérimentales	199
2.2.2. Résultats bruts	199
2.2.3. Ontologie des gènes issus du microarray : vue globale	200
2.3. HRI régule l'expression de gènes lors de la réponse au stress induite par le Bortezomib	200
2.3.1. Ontologie des gènes de la condition contrôle « HeLa shNE – non traitée vs. HeLa shNE – Bortezomib »	200
2.3.2. Ontologie des gènes de la condition « HeLa shHRI - non traitée vs. HeLa shHRI – Bortezomib »	201
2.3.3. Cas de figure particulier avec la condition expérimentale « HeLa shNE - Bortezomib vs. HeLa shHRI – Bortezomib »	202
3. HRI, régulateur de l'expression des gènes en condition cellulaire dénuée de stress	204
3.1. Contexte de la recherche	204
3.2. Ontologie des gènes	205
3.3. En conclusion	206
4. HRI est impliquée dans la croissance cellulaire	206
4.1. Contexte de la recherche	206
4.2. La démarche expérimentale	207

4.3. Rôle potentiel d'HRI dans la régulation de la taille des cellules cancéreuses	210
CHAPITRE 5. Discussion	213
Partie 1. Un nouveau rôle de la voie mTOR-eIF4E dans le processus de formation des GS induite par l'agent chimiothérapeutique Bortezomib	213
Partie 2. De nouveaux inducteurs pour la formation des GS en condition de stress chimiothérapeutiques : cas du Sorafenib et du Lapatinib	227
Partie 3. Un rôle nouveau pour la Kinase de stress HRI, protagoniste important dans la formation des GS induites par la drogue anti-cancer Bortezomib	233
CHAPITRE 6. Conclusion	239
CHAPITRE 7. Perspectives	241
CHAPITRE 8. Bibliographie	245
CHAPITRE 9. Annexes	271
Annexe 1 : Tableaux des gènes analysés par micro-array	271
Annexe 2 : Publications et communications scientifiques	306

Liste des figures

Liste des figures de l'introduction

Figure 1. De l'ADN à l'ARN et vers la protéine

Figure 2. Le cycle cellulaire

Figure 3. Les "Hallmarks" émergentes du Cancer

Figure 4. Illustration de la voie de dégradation des protéines par le protéasome

Figure 5. Structure chimique du composé Bortezomib

Figure 6. Le protéasome, NFkB et Bortezomib

Figure 7. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe de l'ARNm chez les eucaryotes

Figure 8. Zoom sur l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe de l'ARNm

Figure 9. Contrôle de la traduction par le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et ses kinases associées

Figure 10. La structure de la protéine HRI

Figure 11. Modèle de formation de l'homodimère actif et stable d'HRI, par étape d'autophosphorylation multiple

Figure 12. Schématisation d'eIF4E et ses sites de liaisons à la coiffe et eIF4GI.

Figure 13. L'inhibition d'eIF4E altère le processus de cancérogenèse

Figure 14. Schématisation de 4E-BP1

Figure 15. Schématisation de la protéine eIF4GI et ses domaines

Figure 16. Structure représentative des protéines TOR

Figure 17. A propos de mTOR et ses complexes

Figure 18. Les SG sont dynamiques

Figure 19. Bortezomib induit l'accumulation de l'ARNm p21 dans les SG comme démontré par la fluorescence locale (FISH)

Figure 20. Rôle potentiel des SG dans la régulation de l'expression de l'ARNm p21

Liste des figures de l'article du chapitre 1 des Résultats

Figure 1: Inactivating eIF4E or reducing its levels in HeLa cells impairs SG formation without affecting phosphorylation of eIF2 α

Figure 2: Depletion of either mTOR or Raptor as well as chemical inactivation of mTOR alters SG formation in HeLa cells without affecting eIF2 α phosphorylation

Figure 3: mTOR inactivation-induced hypophosphorylation of 4E-BP1 prevents eIF4E-mediated SG formation by disrupting its interaction with eIF4GI

Figure 4: eIF4GI is required for formation of SG, which is antagonized by 4E-BP1

Figure 5: PP242 and depletion of either eIF4E or eIF4GI downregulate the SG-associated p21 pathway and sensitize cancer cells to Bortezomib

Figure 6: Both depletion of p21 and depletion of pp242 inhibit the formation of Bortezomib-resistant tumors in the chick CAM assay

Figure 7: Our working model of mTORC1-eIF4E-4GI-dependent mode of SG assembly

Liste des figures du chapitre 2 des Résultats

Figure 1. Sorafenib induit la formation des granules de stress au sein des HeLa et MCF-7

Figure 2. Celecoxib induit la formation des granules de stress au sein des HeLa et MCF-7

Figure 3. Observation de la formation des granules de stress au sein des MCF-7

Figure 4. Lapatinib induit la formation des granules de stress dans la lignée cellulaire cancéreuse du col de l'Utérus HeLa

Figure 5. Celecoxib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction

Figure 6. Observation de la formation des granules de stress dans les lignées cellulaires du cancer du foie (Huh7 et Hep3B)

Figure 7. Sorafenib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction

Figure 8. Sorafenib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction dans les cellules d'hépatocarcinomes

Figure 9. L'inhibition de mTOR par PP242 affecte la formation des GS induite par Sorafenib

Figure 10. La formation des GS corrèle avec une résistance des cellules à l'Apoptose et un clivage faible de la caspase 3

Figure 11. La formation des GS corrèle avec une résistance des cellules à l'Apoptose

Figure 12. Lapatinib induit la formation des granules de stress dans les lignées cancéreuses du sein MCF7 et T47D résistantes au Lapatinib mais pas dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T sensibles à Lapatinib

Figure 13. Lapatinib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction

Figure 14 La formation des GS corrèle avec une résistance des cellules à l'Apoptose

Liste des figures du chapitre 3 des Résultats

Figure 1. La déplétion d'HRI est effective au sein des cellules HeLa shHRI

Figure 2. La déplétion d'HRI affecte modérément l'initiation de la traduction

Figure 3. Exemple de validation du microarray par q-RT-PCR

Figure 4. Mesure du Forward Scatter d'une cellule par cytométrie en flux

Figure 5. Mesure du Side Scatter d'une cellule par cytométrie en flux

Figure 6. Analyse de la taille des cellules du sang

Figure 7. Analyse de la taille des cellules HeLa déplétées en HRI

Liste des figures supplémentaires

Supplementary data 1.

(A) 4EGI disrupts eIF4E-4GI association as assessed by capbinding assays

(B-C) Rescue experiments

(D-F) Depletion of either eIF4E or mTOR impairs formation of SG in MCF-7

Supplementary data 2. Localization of mTOR in SG

Supplementary data 3. PP242 and Torin1inhibit SG formation

Supplementary data 4. The SG inhibitor pp242 has a modest effect on general translation initiation

Supplementary data 5.

(A-B) Depletion of 4E-BP1 rescues Bortezomib-SG formation and eIF4E-4GI interaction during mTOR inhibition

(C-E) Depletion of 4E-BP2 does not rescue SG formation during mTOR inhibition

(F-G) 4E-BP1 antagonizes eIF4E-eIF4GI association

Supplementary data 6. Depletion of eIF4GI impairs formation of SG.

Supplementary data 7. PP242 sensitizes MCF-7 cells to Bortezomib-mediated apoptosis in vitro

Liste des abréviations

3' ou 5'UTR 3' ou 5' UnTranslated Region

4E-BP: eIF4E-binding proteins

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Akt ou PKB : Protéine Kinase B

ARN : Acide ribonucléique

ARNi: ARN d'interférence

ARNm: ARN messenger

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transfert

ATP: Adénosine-5'-Triphosphate

CAM assay: ChorioAllantoïenneMembrane assay

Cdc: Cell division complex

CDK: Cyclin Dependant Kinase 1

C-myc: Cellular myelocytomatosis oncogene

Dcp: Eukaryotic mRNA decapping protein 1

DDX3: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box 3

eEFs: Eukaryotic Elongation Factors

EGFR: epidermal growth factor receptor

eIF: eukaryotic translation initiation factors

eIF4E: eukaryotic Initiation Factor 4E

eIF4GI: eukaryotic Initiation Factor GI

eIFs: Eukaryotic Initiation Factors

ER: estrogen receptor

FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FISH : Fluorescence In situ Hybridization
FMRP: fragile X mental retardation protein
FRAP/mTOR : FKBP12 Rapamycin Associated Protein / mammalian Target Of Rapamycin
FRAP: Fluorescence recovery after Photobleaching
FXR1: fragile X mental retardation-related protein 1
G3BP: Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
GCN2: general control nonderepressible 2
GDP: guanosine diphosphate
GS : Granules de Stress
GTP: guanosine triphosphate
GTPase: guanosine triphosphate hydrolase
HCC : Hépatocarcinome
HER ou ErbB2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF-1: facteur induit par l'hypoxie-1
HRI: heme-regulated initiation factor 2 α
HuR: Hu protein R
I κ B: Inhibitor of Nuclear Factor-kappa B
IRES: Internal Ribosome Entry Site
m⁷GTP 7-methyl Guanosine Tri-Phosphate
MAPK/Erk: Mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-regulated kinase
MEK: Map/Erk Kinase
Met-ARNTi: ARNT initiateur-méthionine
MKK7: Map Kinase 7
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1: mammalian Target Of Rapamycin complex 1
mTORC2: mammalian Target Of Rapamycin complex 2
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
PABP: poly-A binding protein
P-Bodies ou PB: Processing bodies
PEK: kinase eIF2 α pancréatique
PERK: PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PKR: protein kinase R
Poly(A): Queue polyadénine
PR: progesterone receptor
pRb : protéine du Rétinoblastome
RACK1: Receptor for Activated C-Kinase
Raptor: Regulatory associated protein of mTOR
RBPs: RNA Binding Proteins
RE : réticulum endoplasmique
RNPM: complexe ribonucléoprotéique messager
RSK2: Serine/Thréonine p90 ribosomal S6 kinase 2
RT-qPCR: Real Time quantitative PCR-
Ser51: serine 51
SG : Granules de Stress
shRNA: small hairpin Ribonucleic Acid
siRNA: small interference Ribonucleic Acid

TDRD3: Tudor domain-containing protein 3

TIA-1: T-cell-restricted intracellular antigen 1

TIAR: TIA-1 related protein

TNFR1: TNF receptor

TRAF2: TNF receptor associated factor

TUNEL: terminal deoxynucleotide transferase d-uridine triphosphate nick end labeling

UV: Ultra-Violet

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Avant-propos

Contribution

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai eu la chance de travailler dans le domaine de la recherche qui portait sur les mécanismes de formation des granules de stress à ARN dans le contexte du Cancer. J'ai contribué à plusieurs projets dont certains ont mené à la publication d'articles.

Dans un premier temps, par souci d'intégration au sein de son laboratoire, le Dr. Mazroui m'a demandé de fournir un travail intellectuel, en révisant et en participant aux corrections et remaniements du manuscrit de l'article intitulé « p21 (WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to Bortezomib-mediated apoptosis » et qui fut publié dans Plos One en 2011. Cette publication est listée en Annexe de cette thèse.

Ensuite, après avoir mis en place et développé la technique d'extraction des polyribosomes au sein du laboratoire, j'ai réalisé des analyses de l'état traductionnel de la cellule par études des profils d'expression des polysomes dans le cadre du projet de recherche de ma collègue Cristina Gareau. De plus, j'ai investigué, par immunohistochimie et western blot, la formation des granules de surexpression de FMRP. Au final, ces résultats font, respectivement, partis intégrante de travaux portant sur la caractérisation des granules de stress chez la drosophile et des granules FMRP qui furent publiés dans les journaux Plos One et Biology Open, en 2013. Ces publications sont aussi listées en Annexe de cette thèse.

En parallèle, j'ai aussi mené la rédaction d'une revue de littérature intitulé « Les granules de stress, une question de vie ou de mort » qui est présentement publiée en ligne sur le site web de Médecine Sciences Amérique depuis Juin 2013.

De plus, j'ai co-rédigé un article technique avec ma collègue Pauline Adjibade pour le Journal of Visualised Experiments et qui porte sur la méthode d'extraction des polyribosomes. Ce travail est présentement visible sur le site de JOVE. Et sa référence est indexée en annexe.

Enfin, pendant ces 4 ans d'études, mon projet de recherche principal mena à la rédaction d'un article en tant que co-premier auteur (avec ma collègue et professionnelle de recherche Marie-Josée Fournier) ; un article qui fut publié dans le journal « Molecular and Cellular Biology ». J'ai réalisé ou reproduit la moitié des manipulations y figurant en plus d'avoir participé à leur design, analyses des résultats et à la correction/révision du manuscrit et des datas supplémentaires. Bien entendu, ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la contribution et l'expertise précieuse des coauteurs cités ci-après, dans le chapitre Résultats. Il est à noter que l'article « Inactivation of the mTORC1-eukaryotic Translation Initiation Factor 4E pathway alters stress granules formation » constitue la première partie du chapitre « Résultats » de ce présent travail de thèse.

De plus, j'ai initié et mené avec l'aide d'Andréanne Savard, stagiaire d'été en 2012 au Baccalauréat, un projet exaltant sur le criblage des drogues chimiothérapeutiques qui pourraient induire la formation des granules de stress au sein des cellules cancéreuses. Ce projet est présentement réalisé en collaboration avec ma collègue Pauline Adjibade et Marie-Josée Fournier. Ces travaux sont toujours en cours et ne sont présentés ici, dans le chapitre Résultats, qu'à titre de manuscrit en préparation.

Enfin, des résultats préliminaires ont été obtenus, en collaboration avec ma collègue Marie-Josée Fournier, sur le rôle de la kinase HRI (Heme Regulated translational Inhibitor) dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes en condition de stress chimiothérapeutique dû au Bortezomib. Notre but, ici, étant d'investiguer le niveau d'implication d'HRI dans la réponse cellulaire face au stress chimiothérapeutique mais aussi dans la réponse cellulaire normale.

Remerciements

La réalisation de ce Doctorat fut une expérience des plus surprenante, enrichissante à tous les niveaux, parsemée de moments de doutes extrêmes et de joies intenses. Je prends donc quelques instants pour chaleureusement remercier l'ensemble des personnes qui m'ont accompagné tout au long de ce périple, devrais-je dire, cette « quête du Graal » qu'est le Doctorat.

Si je ressors éprouvée à l'issue de ces quatre années de thèse, je suis non seulement heureuse et fière d'avoir pu surmonter ce défi mais aussi profondément reconnaissante envers tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont permis d'atteindre cet objectif.

Car ce sont dans les moments difficiles que l'on reconnaît vraiment les gens sur qui on peut compter et qui croient en vous et en votre capacité à réussir !

Sachez que cette thèse s'avère être le fruit du travail acharné d'une équipe dévouée à la Recherche et à l'élucidation de l'énigme entourant le lien entre le Stress et le Cancer ; et plus précisément les mécanismes de formation des granules de stress dans le contexte de la chimiorésistance.

En premier lieu, je tiens donc à remercier mes parents. Maman, Papa, MERCI pour votre amour inconditionnel et votre soutien sans limites qui me permettent d'avancer dans tout ce que j'entreprends.

Ensuite, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Rachid Mazroui sans qui rien n'aurait été possible. Nos correspondances professionnelles lors de ma dernière année de Master, en France, ont été l'élément déclencheur pour cette aventure québécoise. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez apportée en mettant un projet aussi exaltant entre mes mains. Merci pour votre disponibilité et votre soutien de chaque jour et ce, quelques soit les évènements. Merci de votre compréhension sans bornes, pour votre ouverture d'esprit et patience malgré mes idées saugrenues, votre écoute, votre aimable gentillesse et chaleureux encouragements, vos conseils toujours pertinents et bien évidemment

pour m'avoir mené avec brio vers l'obtention de ce diplôme. Merci de m'avoir fourni tous les éléments nécessaires à l'avancement de mes projets de recherches. Je me considère honorée d'avoir été accueillie dans votre laboratoire et d'avoir participé à son essor.

Dr Mazroui, pour tout ce que vous m'avez appris et apporté et ce, bien au-delà du doctorat : Merci !

« C'est le rôle essentiel du professeur d'éveiller la joie de travailler et de connaître. »

Albert Einstein (Extrait de Comment je vois le monde)

J'aimerais terminer en remerciant vivement le Dr Yves Labelle pour ses précieux conseils tout au long de mon doctorat, nos conversations stimulantes, son soutien dans les moments de doutes et son aide à la correction de mes différents écrits. Merci de votre gentillesse et pédagogie, Dr.Labelle.

Enfin, je voulais exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon jury, qui se compose de mon directeur de recherche, du Dre Barbara Papadopoulou, du Dre Katherine L.B. Borden, du Dr Fawzi Aoudjit, et du Dr Jacques Landry pour avoir accepté de corriger et d'évaluer la qualité de mon travail présent tout au long de cette thèse et pour l'enthousiasme témoigné à cet égard.

Aux membres du laboratoire :

Mille fois merci d'avoir pris le temps de me former. Vos compétences respectives m'ont été d'un grand secours à maintes reprises et votre compagnie était une grande source de motivation.

Je remercie chaleureusement Marie-Josée Fournier, parce que Marie, peu importe l'expérience à mener, entre tes mains, celle-ci devient un succès. Merci pour ta gentillesse sans limite et ton soutien de tous les jours. Saches que ta grande expérience ont été d'une aide incroyable dans l'avancée de mes projets.

Je remercie aussi les anciennes du laboratoire qui ont fait preuve d'un courage sans faille et d'une motivation extrême pour achever dans les temps et avec brio

leurs diplômés au sein du laboratoire. J'entends par là Sophie Mokas et Samia Mellaoui. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite.

Les filles, vous êtes des perles rares ! A la différence de certains, vous n'abandonnez jamais, vous faites preuve d'une grande droiture morale et vous répondez toujours présentes pour soutenir les gens. Alors merci d'avoir été là pour moi. Vous faites parties de mes modèles de Science !

Je tiens aussi à vivement remercier Christine Fillion. Christine, bien plus que ma collègue de travail, une personne formidable, une confidente précieuse, sur qui j'ai toujours pu compter pendant toutes ces années de doctorat. Tu es toujours souriante et pleine de joie de vivre. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Tu m'as appris comment résoudre le moindre problème technique et on sait toi et moi qu'il en arrive à chaque jour! J'avoue qu'à ton départ je me suis sentie un peu perdue parce que lorsque je me tournais instinctivement vers ta chaise vide, tu n'étais plus là et cela m'a beaucoup manqué.

N'oublions pas David Martel pour son enthousiasme au travail et l'organisation des happy hours qui ont égayé nos vies d'étudiants stressés. Merci à toi.

A Melle Cristina Gareau, Merci pour votre neutralité et conscience professionnelle à toute épreuve. A ces qualités qui ont ravi mes années de doctorat ... !

Enfin, je remercie Andréanne Savard pour sa gentillesse sans conteste et son travail efficace tout au long de son stage d'été. Andréanne, tu as tout d'une future chercheuse ! Je ne sais pas si on peut rêver mieux comme stagiaire ! Ce fut un plaisir de travailler avec toi et d'avoir à diriger ton travail !

A Melle Pauline Adjibade, notre nouvelle venue au laboratoire : Bonne chance dans tes projets, ma chère. Merci d'avoir fait de ma dernière année de doctorat au Laboratoire, un moment agréable empli d'un grand soutien moral et de gentillesse.

A vous qui avez fait des journées de Labo, des moments des plus agréables:

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des laboratoires du site de recherche de l'Hôpital St François d'Assise et du Centre de Recherche de l'Hôtel Dieu de

Québec car, à un moment ou à un autre, vous avez répondu à mes questions ou vous m'avez fourni ou prêté du matériel nécessaire à la réalisation de ce projet.

Un Merci très spécial au Dr.Khandjian et son équipe pour leur aide et leurs conseils toujours avisés. Aussi, je n'oublie pas le Dr Alexandre Brunet, du laboratoire de Cytométrie du CHUL. Merci de ta pédagogie quant à l'enseignement des techniques de FACS et de ta gentillesse.

A M. Richard Réhel : Richard, mon cher Richard ! Tu es le soleil du site de recherche de l'Hôpital St François d'Assise. Toujours disponible, tu sais comment résoudre le moindre problème et tu as toujours le mot pour rire. Tes viennoiseries du Vendredi matin furent mon réconfort de ce doctorat. Ta gentillesse et ta bonne humeur furent, sans conteste, le soutien idéal qui m'a permis de surmonter les journées de labo les plus grises ... Merci d'avoir toujours répondu présent pour moi !

Enfin, je remercie mes collègues et amis (vous vous reconnaîtrez, je le sais !) des centres de recherches du Québec pour les bons moments passés ensemble. Merci, au personnel du Centre de rendre les choses le plus simple possible. Merci Mélanie et Roberta de toujours être disponible pour démêler mes histoires administratives et pour votre générosité sans faille.

Aussi, Mme Andrée Filiatrault, je ne vous oublie pas. Vous avez été d'un soutien inconditionnel et malgré toutes vos obligations, vous m'avez aidé comme personne dans chaque étape administrative de mon doctorat. Nous sommes chanceux de vous avoir, nous étudiants de l'Université Laval !

A ma famille :

Maman, Papa, comment vous exprimer ce que je ressens tant mon amour pour vous est grand. Vous avez tout sacrifié pour moi, pour que j'aie la vie douce et que je puisse réaliser mes rêves. Vous êtes mes piliers, mes mentors, mes modèles de vies. Vous restez ceux vers qui je me tourne quand tout va bien ou quand tout va mal. Merci du fond du cœur de m'avoir suivi et soutenu pendant toutes mes études et de m'avoir donné sans compter.

Un immense Merci à ma Maman. A toi, ma Confidente, celle qui m'a appris à être forte quel que soit les circonstances ; celle qui a pansé mes blessures de petite fille pour que, petit à petit, je devienne une grande fille ; celle qui m'a appris que la diplomatie et le repli stratégique est la clé de beaucoup de problème. Et parce qu'on a qu'une Maman ... je t'en prie, prends soin de toi et un peu moins de moi et guéris vite!

Un immense Merci à mon Papa qui m'a enseigné de toujours garder la tête haute et de ne jamais baisser les bras ! Parce qu'on est des Coudert ! Merci pour l'admiration que tu me portes et qui me permet de croire en moi quand rien ne va. Tu es un fin psychologue qui se cache sous les traits d'un homme un peu rustre et pourtant tu n'as peur de rien et tu fais passer ta femme et ta fille avant ta propre personne. Alors, Papa, s'il te plaît, ménages toi un peu et saches que je suis fière de toi !

Je n'aurai pas réussi sans vous mes chers parents !

Merci à mes grands-parents qui ont toujours soutenu leur petite fille sans jamais vraiment comprendre ce qu'elle faisait dans la vie.

Merci à ceux qui sont partis bien trop tôt et qui ont énormément comptés dans ma vie.

A mes amis :

Vous qui m'avez soutenu tout au long de ces années. Malgré mon caractère un peu spécial et mes sauts d'humeur explosifs, je vous adresse un merci chaleureux à tous. J'ai partagé tellement de choses avant et pendant mon doctorat avec chacun d'entre vous. Quel que soit votre fuseau horaire, vous êtes toujours là pour moi... alors, Merci à Tous! C'est un honneur que d'être votre ami. Mes remerciements les plus tendres vont à Laëtitia Calligaris, Petra Horakova, Joris Pauty et Kassem Makki, mes amis de toujours. Sans vous, je ne serai pas où j'en suis présentement. Je ne vous remercierai jamais assez pour vos encouragements de tous les jours, votre soutien permanent et ce malgré mon caractère de chat et mon terrible défaut de ne pas donner de nouvelles. Merci

pour nos fous rires quotidiens, que ce soit en direct, par téléphone ou par mail ... Tout ceci a permis d'instaurer un équilibre certain entre la vie de doctorante et ma vie personnelle. J'aurai tant à dire, à chacun d'entre vous, pour vous exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance d'être resté à mes côtés envers et contre tout ... Mais je ne rédige pas une thèse sur les bienfaits de l'amitié ... donc je m'arrêterai là. Sachez simplement que vous avez été ma lumière dans mes moments les plus sombres et mon arc en ciel dans mes moments de bonheurs intenses. Vous êtes les frères et sœurs que je n'ai jamais eus. Et comme dans toute famille, on a eu nos moments difficiles mais jamais vous ne m'avez laissé tomber. Pour tout cela et plus encore : MERCI !

A ma chère Amélie. Tu es un modèle de Science, un modèle de vie ! On a eu nos hauts et nos bas mais au final, c'est ensemble qu'on a réussi à traverser ce doctorat. Au fil du temps, ton amitié m'a donné courage, force et gaieté. Alors je te dis MERCI pour ce lien qui nous unit.

A toi Sophie, sans qui je n'aurai pas réussi à surmonter les épreuves du doctorat. Ton grain de folie, ton acharnement au travail et ton perfectionnisme m'ont poussé à me dépasser et à toujours voir la vie du bon côté. Merci d'être une amie aussi formidable et dévouée.

Je tiens à dire un MERCI tout spécial aux amis rencontrés lors de cette aventure doctorale.

A ma chère Marie, notre dame tempérance de la gang, ma supportrice de chaque jour. Tu as toujours le mot qui me reconforte, la blague/délire qui me font sourire et le potin qui me fait défaillir ! Ton amitié m'est tellement précieuse. Je te remercie pour tes conseils, d'être toujours là et d'être aussi patiente avec moi ... Et vive James Blunt !

A mes amis du Lycée, de Médecine, d'Université Bordeaux I/II et de l'Université Bordeaux Montaigne (ma gang d'HPMS), à Emeline, Laurence, Sébastien, Julie, Gad, Rémi et Eren et toute la gang de français à Québec : Vos encouragements, votre générosité, votre bonne humeur communicative, votre simplicité et nos soirées ensemble furent pour moi, le soutien idéal tout au long de ces 4 années de doctorat.

xxx

A ma professeure de chant, Melle Geneviève Paré : Merci pour ta grande sagesse qui rend philosophe même face aux obstacles les plus difficiles, pour ta générosité sans limite et ton énergie débordante. A toi qui m'enseigna à travers le chant, à avoir confiance en moi et à ne pas trop me « taper sur la tête » ; Merci du fond cœur.

Merci à ces personnes qui n'ont fait que passer et par leur amitié fugace, m'ont permis de tirer des leçons sur la vie et le doctorat.

Merci à chacun de mes amis qu'ils soient ici ou ailleurs, à tous ceux que j'ai croisé sur le chemin, qui ont participé souvent sans le savoir à ce que cette histoire soit une réussite.

J'ai certainement oublié des personnes, mais ne m'en voulez pas, vous êtes dans mon cœur malgré tout et je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir été là pour moi.

Aux organismes subventionnaires :

Enfin, je me dois de souligner les contributions généreuses des organismes subventionnaires du conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), du Canadian Institute Health Research (CIHR) et de la Canadian Fondation for Innovation qui ont servi à financer la majeure partie de mes travaux de doctorat.

Que la lecture de cette thèse vous soit douce...

En souvenir du doctorat:

Les Elles

(Chanson de l'artiste Ingrid St Pierre)

Petite moi rafistolée
Un peu plus grande
Un peu plus forte
Reprends la route la tête haute
Pour ne plus jamais la rendre

Et les quelques plumes perdues
Je les rattraperai doucement
Ficelles et papiers collants
Je bricolerai mes ailes d'avant

Et tout le ciel espère
Des envolées sans les volières
Un peu plus grande un peu plus forte

Et les quelques plumes perdues
Je les rattraperai doucement
Ficelles et papiers collants
Je bricolerai mes ailes d'avant

Je dédie cette thèse à ma mère, Véronique et à mon père, André qui m'ont appris
la chose suivante:

« Ne perds jamais l'enthousiasme de l'enfance et les choses viendront à toi ! »

Et rappelez-vous toujours de ceci:

*«Les deux guerriers les plus puissants sont la patience et le temps. N'oublie pas
que les grandes réalisations prennent du temps et qu'il n'y a pas de succès du
jour au lendemain»*

Léon Tolstoï

« Un problème sans sa solution est un problème mal posé.»

Albert Einstein

CHAPITRE 1. Introduction générale au Cancer et à la réponse au Stress

1. GÉNÉRALITÉS

1.1. La cellule eucaryote et ses constituants

Les cellules eucaryotes sont limitées par une membrane qui retient les constituants ensemble et qui gouverne ce qui entre dans la cellule et ce qui en sort. Elles contiennent un cytoplasme dans lequel se trouvent des organites tels que les ribosomes, les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique lisse et granuleux, les endosomes, lysosomes et peroxysomes. Les cellules eucaryotes possèdent surtout un noyau qui leur permet d'isoler l'information génétique supporté par l'ADN (ou Acide DésoxyriboNucléique) du reste de la cellule. (Alberts et al., Molecular Biology of the cell-5th edition, 2008 ; Lodish et al., Molecular Cell Biology-7th edition, 2012)

1.2. De l'ADN à la protéine

Unité biologique fondamentale responsable de la transmission des caractères héréditaires des parents à leur enfant, les gènes sont des segments d'ADN qui déterminent les caractéristiques particulières d'une personne. On compte environ 30 000 gènes humains différents. Le génome humain code pour un grand nombre de protéines différentes. Chaque protéine est caractérisée par une séquence unique d'acides aminés. Cette séquence va déterminer la conformation et la fonction de la protéine. L'assemblage des acides aminés (synthèse de la protéine ou traduction) n'a pas lieu dans le noyau (où l'ADN est situé) mais dans le cytoplasme. Il y a donc nécessité d'un intermédiaire, qui porte le message et qui peut quitter le noyau pour servir de matrice dans le processus d'assemblage. Cet intermédiaire n'est autre que l'ARNmessenger (ARNm). L'ARNm est copié à partir de l'ADN via un mécanisme appelé transcription (processus réalisé par un ensemble de facteur dont les ARN polymérase). Au final, l'ARNm porte donc toutes les informations nécessaires sur la nature, l'ordre et le nombre des aminés à assembler afin de former, ultimement, une protéine. Chez les eucaryotes, l'ARNm primaire nouvellement synthétisé subit une étape supplémentaire dite

d'épissage qui permet d'exciser certaines régions non codantes (ou introns). Le transcrit épissé est alors doté d'une coiffe en 5' et d'une extrémité 3' polyadénine pour former l'ARNm mature qui sera traduit en protéine dans le cytoplasme (Figure 1). (Alberts et al., Molecular Biology of the cell-5th edition, 2008 ; Lodish et al., Molecular Cell Biology-7th edition, 2012)

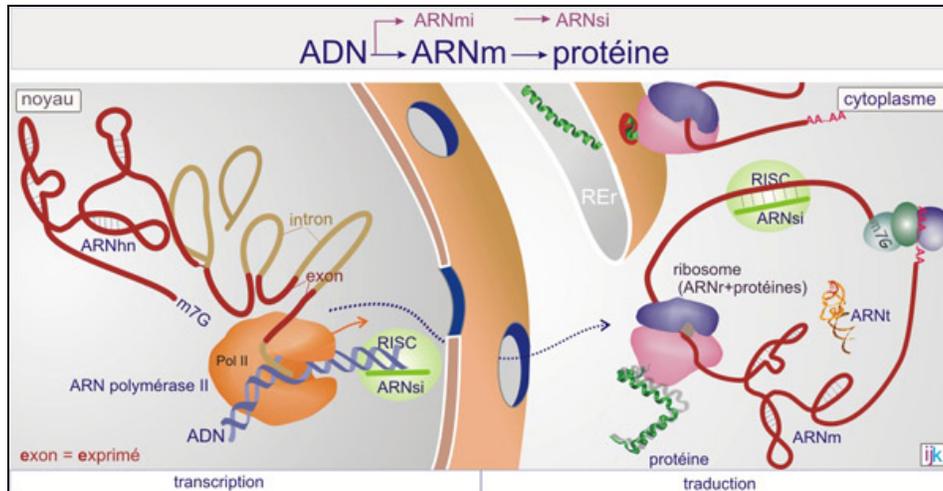


Figure 1. De l'ADN à l'ARN et vers la protéine. (Adapté de Herceptin project 2007)

En résumé, les cellules vivantes sont constituées d'un grand nombre de molécules qui forment des réseaux d'interactions fonctionnelles. Certaines de ces molécules s'organisent en assemblages particuliers que l'on nomme « organites ». Ainsi, de nombreuses cellules sont formées en permanence dans l'organisme. Celles-ci doivent maintenir leurs caractéristiques fonctionnelles intactes. Ce maintien des caractéristiques découle de l'information génétique. Il doit donc exister un mécanisme qui permet de dupliquer cette dernière.

1.3. Division et Cycle cellulaire

Toutes les cellules du corps suivent un cycle de vie. Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère se divise pour générer deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Les étapes du cycle cellulaire ont été définies par rapport aux événements majeurs de la vie de la cellule : la synthèse de l'ADN et la division cellulaire (Figure 2). Ce processus comprend deux phases majeures : l'interphase et la mitose. L'ensemble est classiquement divisé en quatre phases : G1, S, G2 et M. Les phases G1 et G2, sont des phases de jonction (« Gap ») qui précèdent respectivement la phase S (« Synthesis » ou synthèse), durant laquelle l'ADN est répliqué, et la phase M (« Mitosis » ou mitose), au cours de laquelle les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules-filles. (Alberts et al., *Molecular Biology of the cell*-5th edition, 2008 ; Lodish et al., *Molecular Cell Biology*-7th edition, 2012).

Le déroulement correct des phases successives du cycle cellulaire est assuré par une famille de kinases sérine-thréonine dites kinases dépendantes des cyclines (CDK). La chronologie de leur activation est déterminée par leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylations/déphosphorylations), et par l'association à une cycline, qui constitue la sous-unité régulatrice du complexe enzymatique. Il existerait 13 CDKs et 25 cyclines (pour revue Schafer KA.1998 ; Verneulen et al, 2003). Chacun des composants de cette voie peut être dérégulé dans un processus cancéreux, et de plus en plus de données désignent cette voie comme une cible obligatoire des étapes de l'oncogénèse dans pratiquement tous les cancers. (Adapté de Alberts et al., *Molecular Biology of the cell*-5th edition, 2008 ; Lodish et al., *Molecular Cell Biology*-7th edition, 2012)

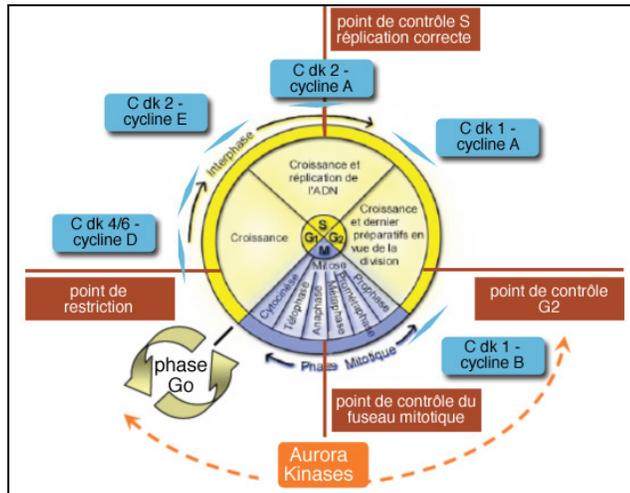


Figure 2. Le cycle cellulaire. C'est grâce à la « multiplication » des cellules que le corps humain peut grandir jusqu'à l'âge adulte, que les cellules mortes sont remplacées et que les blessures guérissent. Cette multiplication des cellules est tout à fait normale et indispensable à la vie. Dans le contexte du Cancer, une cellule cancéreuse est une cellule normale qui a subi plusieurs modifications. Cette cellule, devenue anormale, commence à se multiplier de façon incontrôlée dans un organe ou un tissu d'un organisme. Cette croissance anormale entrave tôt ou tard le bon fonctionnement des organes, ce qui peut conduire au décès de l'organisme. (Alberts et al., Molecular Biology of the cell-5th edition, 2008 ; Lodish et al., Molecular Cell Biology-7th edition, 2012) (Adapté de <http://www.arcagy.org>).

2. LE CANCER

2.1. Quelques généralités

2.1.1. Historique et Statistique

Le terme Cancer provient du latin cancer « crabe », proche parent du terme grec karkinos (« écrevisse »). Ce nom aurait été utilisé pour la première fois par Hippocrate lui-même quand il décrivit des lésions malignes qui touchaient la peau, le sein, l'estomac, le col de l'utérus et le rectum. Selon-lui, le cancer « avait des veines étendues de tous côtés, de même que le crabe à des pieds », d'où son nom. Il devait se référer à l'aspect de la tumeur ressemblant à un crabe, sûrement à cause de la vascularisation qui l'entoure. De nos jours, le « Cancer » est devenu un terme général désignant une pathologie pour laquelle certaines cellules d'un tissu/organe /organisme prolifèrent de façon anarchique et adoptent un comportement atypique dit anormal, qui ultimement, vont nuire.

Le Cancer est responsable d'un décès sur huit dans le monde ; une mortalité supérieure à celle du Sida, de la Tuberculose et du Paludisme réunis. Au Canada, le cancer est la principale cause de décès depuis 2005. En 2012, plus de 186,000 nouveaux cas ont été diagnostiqués avec 75,700 décès liés à cette maladie (Jemal et al, 2011).

2.1.2. Les étapes de développement du cancer

Dans un tissu sain, il règne un équilibre entre les cellules qui se reproduisent et les cellules qui meurent. Le cancer peut survenir lorsqu'il y a perte de cet équilibre. Le tissu peut alors commencer à se développer pour former une tumeur constituée de cellules dont la croissance et la division sont anormales. En général, le cancer suit trois étapes principales de développement qui sont l'initiation, la promotion et la progression. Pendant ces étapes, la cellule normale

prolifère et forme une masse cellulaire primitive (néoplasme), parfois appelée « tumeur maligne primaire », qui, avec le temps, envahit les structures avoisinantes saines (infiltration ou invasion). En empruntant le réseau lymphatique, les cellules malignes peuvent atteindre des organes très éloignés. C'est le processus de métastase. Les métastases aggravent la pathologie en perturbant profondément le fonctionnement des organes contaminés (Nowell PC, 1976). (Knowles and Shelby.,Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer-4th edition, 2005 ; Weinberg RA., The biology of Cancer-2th edition, 2013)

2.2. Le Cancer, une transformation cellulaire progressive et évolutive

2.2.1. La génétique moléculaire du cancer

La plupart des cancers sont causés par un changement ou une lésion qui se produit dans nos gènes. Un changement dans un gène est appelé une mutation génétique. Les mutations peuvent affecter la structure d'un gène et l'empêcher de fonctionner correctement. Ce changement (accidentel) dans la séquence de l'ADN du gène est susceptible d'entraîner un déséquilibre qui se traduit par l'apparition d'une anomalie dans le fonctionnement de la cellule. Certaines des mutations génétiques confèrent à la cellule la capacité de survivre dans les conditions où normalement elle disparaît par « suicide » (apoptose). D'autres conduisent à un avantage prolifératif: les cellules finissent par former une masse appelée "tumeur". Ces mutations peuvent s'additionner ; ce qui fait que la cellule prolifère exagérément et est capable d'infiltrer son environnement sans risque d'être détruite par apoptose. (Knowles and Shelby.,Introduction to the Cellular

and Molecular Biology of Cancer-4th edition, 2005 ; Weinberg RA., The biology of Cancer-2th edition, 2013)

Pour qu'une cellule se transforme, il faut que les mutations surviennent dans un ordre précis, afin d'échapper à la surveillance de l'organisme. Par exemple, sur un modèle in vitro, il faut d'abord augmenter l'activité de l'enzyme télomérase, celle-ci permettant une réplication illimitée du génome. Puis, la cellule doit perdre la sensibilité aux inhibiteurs du cycle cellulaire et aux signaux de suicide (se protéger contre l'apoptose). Enfin, la cellule doit augmenter la sensibilité aux signaux de prolifération. Cet ordre est important car une cellule saine n'accepte pas facilement de mutations « transformantes » ; elle protège l'organisme en se suicidant ou en devenant sénescence (arrêt définitif de la prolifération). Les anomalies dans l'ADN sont détectées par de nombreuses protéines qui s'associent à lui. La cellule fait appelle, entre autre, à la protéine p53, la gardienne du génome, qualifiée de suppresseur de tumeur. Le constat est fait que dans de nombreuses tumeurs, p53 elle-même est modifiée. Cette modification entraîne une perte de fonction qui amène donc la cellule à accumuler des erreurs dans son ADN. Et c'est l'accumulation de ces «altérations génétiques» au sein de la cellule suivie de la prolifération anarchique de ces cellules devenues anormales qui seront à l'origine du cancer.

2.2.2. Les « Hallmarks » du Cancer

Actuellement, on dénombre plus de 100 types de cancers différents. Cependant, certaines propriétés communes semblent être partagées par la majorité des cellules cancéreuses. En 2011, dans leur article revisité « The Hallmarks of Cancer », les auteurs Hanahan et Weinberg ont montré que la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse ne passait plus seulement par l'acquisition des 6 caractéristiques bien connues et qui sont: l'indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent normalement la prolifération cellulaire, l'échappement au mécanisme d'arrêt de croissance , la capacité proliférative qui n'est plus limitée, l'entrave à l'apoptose, une capacité anormale à susciter

l'angiogénèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif et de production de métastases. Hanahan et Weinberg ont mis en évidence 4 propriétés supplémentaires qui manifestent de l'état « tumoral ou cancéreux » d'une cellule (Hanahan and Weinberg 2011). Les nouvelles caractéristiques sont récapitulées dans la figure 3 ci-dessous.

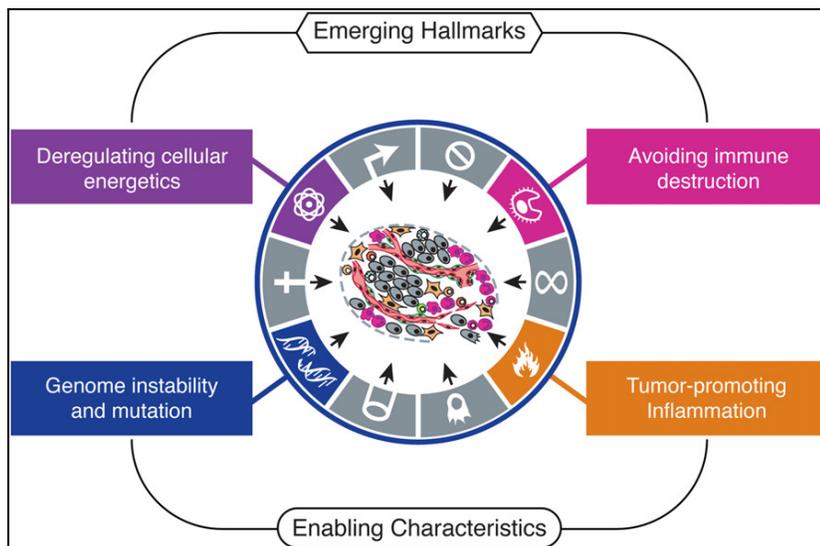


Figure 3. Les "Hallmarks" émergentes du Cancer. La progression tumorale se caractérise par 4 nouvelles caractéristiques, en plus des 6 évoquées précédemment. Ces 4 propriétés qui vont permettre de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses sont ; promouvoir les mutations et l'instabilité génétique; favoriser l'inflammation au sein de la tumeur, promouvoir le métabolisme énergétique au profit de la tumeur; envahir les autres organes par l'extravasation de cellules tumorales dans le réseau sanguin et/ou lymphatique pour la formation de métastases. (Adapté de Hanahan & Weinberg, 2011)

Bien que connu depuis le temps des pharaons, le cancer n'est pas encore associée à une thérapie miracle et chaque année, son incidence et taux de mortalité augmente.

Néanmoins, la recherche sur le cancer fait de belles avancées. Certes, les thérapies anti-cancers sont encore peu nombreuses, parfois inadaptées et à l'origine de résistance de la part du patient. Cependant les nombreux travaux de recherche, qu'ils soient de nature fondamentale ou clinique, menées au cours de ces dernières décennies ont permis d'élucider certaines zones d'ombres concernant le mécanisme de fonctionnement des cellules cancéreuses. Et ultimement, des nouveaux traitements plus efficaces furent mis au point.

2.3. Les Thérapies anti-cancers

Le cancer peut se traiter par chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie et, dans certains cas, par hormonothérapie. Toutefois, nombreux sont les patients qui développent une résistance aux traitements anti-cancers. La résistance des cellules cancéreuses à la mort induite par les traitements anti-cancéreux contribue à la progression tumorale et aux échecs thérapeutiques. De nombreuses équipes de recherche étudient les mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de la mort cellulaire et les phénomènes de résistance des cellules cancéreuses à la toxicité induite par les traitements anti-tumoraux. Un de ces mécanismes est généré par le stress engendré par la prise du traitement anti-cancer et son assimilation par les cellules. Cela aboutit à la formation d'entités plus connues sous le nom de granules de stress (Fournier et al, 2010; Moeller et al, 2004). La radiothérapie et la chimiothérapie sont, à date, des traitements anti-cancers connus pour induire la formation des Granules de Stress (GS), structures cytoplasmiques qui se forment en réponse au stress (Moeller et al, 2004 ; Fournier et al, 2010). Dans le contexte du cancer, les GS sont associés au mécanisme de résistance que déploient les cellules cancéreuses

face aux traitements thérapeutiques (Fournier et al, 2010, Gareau et al 2011, Fournier, Coudert et al, 2013, Moeller et al, 2004). Une section spéciale de cette Introduction sera consacrée aux granules de stress.

2.3.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique pour combattre le cancer, particulièrement pour éliminer les cellules cancéreuses qui se sont dispersées dans l'organisme. Elle implique la prise de médicaments chimiques qui peuvent ralentir ou même bloquer le développement des cellules cancéreuses et, ainsi, les empêcher de se multiplier ou d'envahir d'autres parties du corps. Il existe deux types de chimiothérapies qui sont la chimiothérapie classique et la chimiothérapie ciblée.

Dans le cadre de la **chimiothérapie classique**, les molécules utilisées agissent contre les cellules ayant un fort pouvoir prolifératif telles que les cellules cancéreuses. De façon générale, elles bloquent la réplication de l'ADN. Elles induisent une mort cellulaire programmée (ou apoptose) et sont qualifiées d'agents cytotoxiques. Parmi ces molécules à visée thérapeutique, on peut retrouver les poisons du fuseau mitotique qui empêchent la division cellulaire en inhibant la synthèse des microtubules: les vinca-alcaloïdes et les taxanes (Sinha bk 1995). On retrouve aussi les agents formant des liaisons covalentes entre les guanines de la double hélice de l'ADN tels que les agents alkylants, nitroso-urés et dérivés du platine (Pourquier P, 2011). De plus, il existe des inhibiteurs des topo-isomérases qui ralentissent puis bloquent la synthèse d'ADN et l'expression des gènes tels que les dérivés de la camptothécine ... (Salerno et al, 2010 ; Sinha BK, 1995) et qui sont couramment utilisés en clinique. Enfin, les anti-métabolites qui prennent la place des purines ou des pyrimidines de l'ADN tels que les

analogues puriques, pyrimidiques ou foliques (Tiwari M, 2012) sont aussi des agents anti-cancers couramment utilisés. Ces chimiothérapies dites « classiques » sont encore beaucoup utilisées, notamment pour le traitement des leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse). Cependant, leur manque de spécificité est associé à de nombreux effets secondaires, et parfois à une grande toxicité.

Par opposition aux médicaments de chimiothérapie classique qui s'opposent, globalement, à la multiplication des cellules, la **chimiothérapie ciblée** visent les mécanismes particuliers de la carcinogenèse des cellules. Ainsi, les thérapies ciblées désignent des médicaments dirigés contre des cibles moléculaires : récepteurs, gènes ou protéines impliqués dans les voies de signalisation intracellulaires jouant un rôle dans la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses dites aussi néoplasiques ou dans le développement des tumeurs malignes. Ultimement, ces thérapies vont induire une mort cellulaire programmée et une régression voir disparition de la tumeur.

Parmi ces traitements, on retrouve les inhibiteurs du protéasome tels que le **Bortezomib**, que j'ai utilisé, dans le cadre de mon projet de recherche principal, pour induire la formation des GS. On retrouve aussi des inhibiteurs de croissance cellulaire qui ciblent des récepteurs de tyrosine kinase impliqués dans l'angiogenèse et la progression tumorale tels que **Soranefib**, **Lapatinib**, Imatinib, Temsirolimus... En tant que stress de type chimiothérapeutique utilisé dans le cadre de mon projet secondaire de thèse, une section particulière sera dédiée aux Sorafenib et Lapatinib.

2.4. Le système Protéasome, Bortezomib et Cancer

Le système ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation de la majorité des protéines intracellulaires (Rajkumar et al, 2005). Ce qu'on appelle

communément le protéasome (ou protéasome 26S) est en fait un immense assemblage multiprotéique, constitué de deux complexes distincts, les protéasomes 20S et 19S, qui dégrade les protéines par un mécanisme nécessitant l'hydrolyse d'ATP.

2.4.1. Le protéasome

Le protéasome a une distribution cytoplasmique et nucléaire. Le protéasome 20S renferme, en son sein, la chambre protéolytique interne qui contient les sites actifs responsables de l'hydrolyse des liaisons peptidiques et donc, de la dégradation des protéines cibles. Aussi, chaque extrémité du protéasome 20S est associée à un complexe du protéasome 19S. Le 19S assure la reconnaissance et le dépliement des protéines dont le destin est d'être dégradé. Quand une protéine doit être dégradée, elle est, au préalable, affublée de molécules d'ubiquitines (figure 4). La découverte du mécanisme d'ubiquitinylation est associée aux chercheurs Ciechanover, Hershko, Rose et Varshavsky. Cependant, il est à noter que certaines protéines telles que p21 (Liu et al, 2003), p53 (Asher et al, 2002) ou I κ B (Krappmann et al; 1996) ne nécessitent pas d'ubiquitinylation directe pour être dégradées. En participant à la régulation de niveau d'expression des protéines impliquées dans la mort programmée (apoptose) et le cycle cellulaire, le protéasome joue un rôle central dans la régulation de ces deux processus. Le protéasome est aussi responsable de la dégradation physiologique de protéines intactes et/ou mal repliées au sein de la cellule, processus qui est nécessaire pour le contrôle d'un grand nombre de fonctions cellulaires importantes.

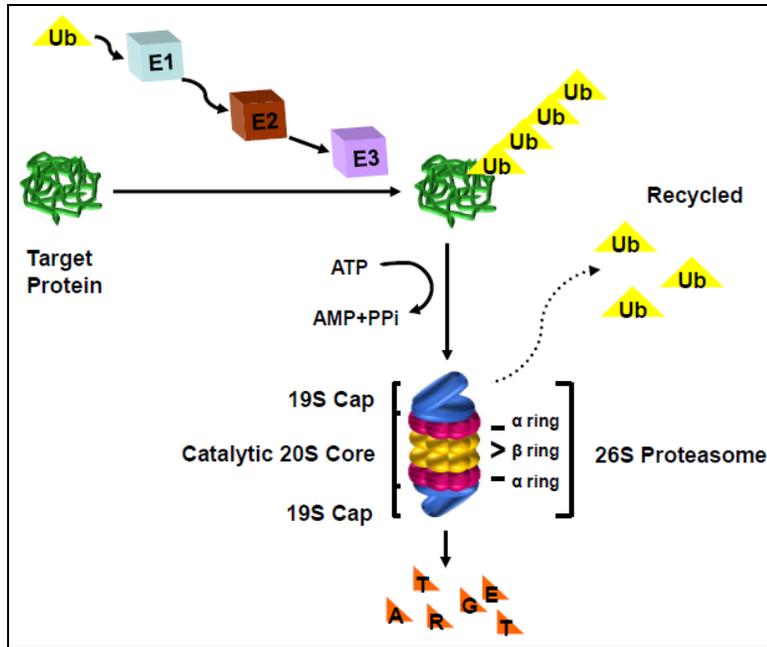


Figure 4. Illustration de la voie de dégradation des protéines par le protéasome. Les protéines devant être dégradées par le protéasome sont marquées avec des molécules d'ubiquitines, via un processus dépendant de l'ATP, grâce aux enzymes E1, E2 et E3. Ces protéines polyubiquitinées sont ensuite reconnues par le complexe régulateur 19S du protéasome 26S. Elles sont ensuite introduites dans le noyau catalytique 20S pour être dégradées; puis les molécules d'ubiquitine sont recyclées. Les protéasome 20S contient quatre anneaux empilés ($\alpha\beta\alpha$): les sous-unités α vont réguler l'entrée de la protéine devant être dégradée tandis que les sous-unités β possèdent des activités enzymatiques. (Adapté de Mujtaba et Dou, 2011)

2.4.2. Rôle du protéasome dans la régulation de diverses fonctions cellulaires

Le protéasome 26S régule de nombreuses fonctions cellulaires, dont les plus importantes sont la mitose, la croissance cellulaire, la réparation de l'ADN, l'inflammation, l'angiogenèse, l'apoptose, et l'expression de plusieurs gènes qui régulent à leur tour d'autres processus (Sherr CJ et al, 1999; Crawford LJ et al, 2011; McConkey DJ et Zhu K., 2008). Ces mécanismes influencés par l'action du protéasome 26S sont parmi les processus altérés ou dérégulés dans les cancers. L'incubation des cellules avec certains inhibiteurs du protéasome, tels que MG132 et lactacystine, peut soit faciliter l'apoptose provoquée par des agents chimiothérapeutiques tels que la gemcitabine et erlotinib (Lind et al, 2001, Dai et al, 2003; Feng et al, 2007; Naujokat et al, 2000), ou est suffisante en soi pour induire l'apoptose (Imajoh-Ohmi et al, 1995; Banerjee et Liefshitz; 2001; Tomoda et Omura, 2000). De nombreux facteurs pro-apoptotiques importants (par exemple p53, Bax et NOXA (Crawford LJ et al, 2011; McConkey DJ et Zhu K., 2008) ou des régulateurs du cycle cellulaire (par exemple p27 (Sherr CJ et al, 1999) sont des substrats du protéasome. Il a donc été suggéré que le blocage de la dégradation de ces protéines avec des inhibiteurs du protéasome pourrait provoquer une accumulation de ces facteurs, et en fin de compte, mener à l'arrêt de cycle cellulaire ou à l'apoptose. En revanche, d'autres études ont montré que les inhibiteurs du protéasome protègent les cellules contre l'apoptose déclenchée par des stimuli tels que l'appauvrissement en facteurs de croissance, les rayonnements ionisants et les glucocorticoïdes (McConkey et Zhu., 2008). De plus, les effets anti-apoptotiques des inhibiteurs du protéasome sont principalement observés dans les cellules quiescentes, alors que l'induction de l'apoptose par ces mêmes composés est observée dans les cellules qui prolifèrent. Ceci conduit à l'idée que l'inhibition du protéasome a des effets plus

sévères dans les cellules cancéreuses. En effet, des études in vitro ont démontré que les inhibiteurs du protéasome ont des effets plus meurtriers dans les cellules cancéreuses que les cellules normales. Par exemple, les cellules de lignées de myélome multiple sont 40 fois plus sensibles à l'apoptose induite par l'inhibition du protéasome que les cellules mononucléées issues de donneurs sains (Hideshima et al, 2001).

L'ensemble de ces résultats ont conduit à la conception et au développement d'une nouvelle génération d'inhibiteurs de protéasome (par exemple, le Bortezomib) sélectionnés pour leur activité anti-tumorale améliorée. En effet, les cellules tumorales se divisent plus rapidement que les cellules saines, et elles sont soumises à une dérégulation des voies de signalisation qui régissent leur fonctionnement; ce qui permet au Bortezomib de cibler majoritairement les cellules atteintes. Les inhibiteurs du protéasome comme Bortezomib, NPI-0052, et carfilzomib, ont récemment atteint le stade clinique. Cela confirme le fort potentiel de ces molécules dans le traitement contre le myélome multiple et d'autres tumeurs malignes hématologiques (Richardson et al, 2003; Richardson PG., 2004).

2.4.3. Le Bortezomib (VELCADE®)

Ce médicament fut synthétisé pour la première fois en 1995. Après des résultats précliniques très prometteurs, cette drogue fut testée en phase 1 d'un essai clinique sur des patients atteints de myélome multiple. Le myélome multiple (appelé également myélome ou myélome plasmocytaire) est une affection maligne des plasmocytes de la moelle osseuse. En Mai 2003, après plusieurs essais cliniques, le Bortezomib fut approuvé par le Food and Drug Administration (FDA) pour être utilisé comme traitement principal des myélomes multiples. (Adams et Kaufmann, 2004). À date, le Bortezomib a déjà été utilisé pour traiter plus de 350 000 patients, à travers le monde.

2.4.4. Structure du Bortezomib

Ce composé chimique de type pharmacologique est un dipeptide de type acide boronique (N-pyrazinecarbonyl-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid) (Figure 5).

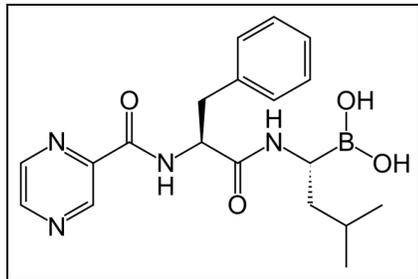


Figure 5. Structure chimique du composé Bortezomib. (Adapté de <http://www.cellsignal.com>)

2.4.5. Mécanisme moléculaire d'action du Bortezomib

L'atome de bore qui constitue le composé Bortezomib va aller se fixer spécifiquement et avec une haute affinité au niveau du site catalytique du complexe 20S (Groll et al, 2006), constituant clé du protéasome 26S. Il bloque, ainsi, l'activité protéolytique du protéasome. Et plus précisément, il inhibe l'activité chymotrypsine (Jackson et al 2005 ; Papandreou et al, 2004). Ceci va inhiber l'action du protéasome qui va cesser de dégrader des protéines. Il y aura accumulation et excédent de protéines au sein de la cellule tumorale. Ce déséquilibre de l'équilibre physiologique intracellulaire va pousser la cellule à activer son programme de mort cellulaire afin d'assurer son autodestruction.

En fait, la capacité thérapeutique de l'inhibition du protéasome par le Bortezomib repose sur l'inhibition du facteur de transcription NFκB (McConkey et Zhu, 2008) qui est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'invasion tumorale et l'angiogenèse (Figure 9) (Gilmore TD, 2006 ; Brasier AR, 2006).

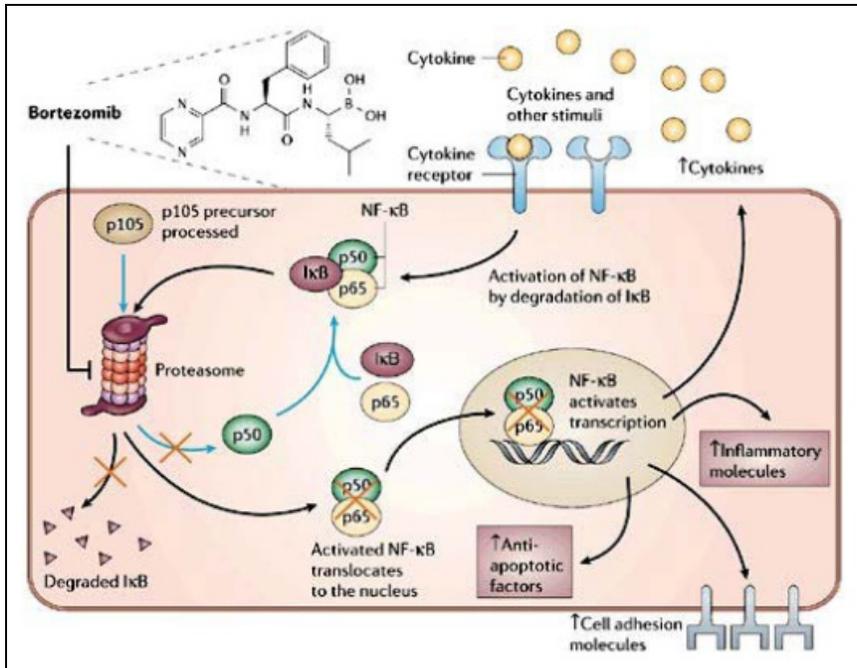


Figure 6. Le protéasome, NFκB et Bortezomib. Le protéasome est un complexe protéolytique qui va dégrader les protéines qui auront été précédemment ubiquitinylée. NFκB est un facteur de transcription qui est généralement associé à son inhibiteur IκB dans le cytoplasme, ce qui rend NFκB. Différents stimuli tels que des cytokines, antigènes, virus ... peuvent activer des voies de signalisation qui vont phosphoryler et ubiquitiner IκB, menant à sa dégradation par le protéasome. NFκB est ainsi libéré et il va transloquer dans le noyau. Dans le noyau, NFκB se fixe aux régions promotrices des gènes qui sont impliqués dans la transcription de molécules intervenant dans les processus d'angiogenèse, de croissance cellulaire, d'inflammation et des facteurs anti-apoptotiques. En inhibant le protéasome, le Bortezomib va inhiber l'activation de

NFkB et les évènements associés qui peuvent promouvoir la survie et prolifération cellulaire tumorale. (Adapté de Serrano-Sanchez, 2009)

2.4.6. Des cas de résistance au Bortezomib

Cependant, les tumeurs solides de différentes origines histologiques présentent généralement une résistance aux inhibiteurs du protéasome en activant des voies anti-apoptotiques tels que NFkB (Mitsiades et al, 2002; Rajkumar SV. et al, 2005). Cette résistance n'est pas due à une difficulté des inhibiteurs du protéasome à pénétrer dans les tumeurs. En effet, dans le cas du Bortezomib, l'inhibition du protéasome est bien effective dans tumeurs solides obtenus par xénogreffes (Adams, 2002 ; Jagannath et al, 2005; Kondagunta et al, 2004; Richardson et al, 2005; Shah et al, 2001; Sunwoo et al, 2001). Pour expliquer ce phénomène, il fut d'ailleurs suggéré que cette résistance impliquait l'activation d'une réponse générale au stress (McConkey et al, 2008, Codoney-Servat et al, 2006, Tang et al, 2008, Rajkumar et al, 2005). En effet, nous avons observé in vitro que le Bortezomib provoquait un état de stress engendrant une réponse protectrice de la cellule. Quand une cellule cancéreuse est soumise à un traitement au Bortezomib, elle inhibe sa traduction générale et initie l'assemblage de GS. Cette formation des GS corrèlerait avec la résistance des cellules cancéreuses au Bortezomib (Fournier et al, 2010). D'où notre intérêt à utiliser l'agent chimiothérapeutique Bortezomib comme inducteur de Stress, lors des expériences menées pendant ce projet de doctorat

2.5. Sorafenib, Lapatinib et Contexte de la Découverte

Depuis la révolution moléculaire des années 80, la connaissance de l'étiologie du cancer a considérablement augmenté, ce qui a conduit à la découverte et au développement de thérapies ciblées qui ont été adaptées pour inhiber les voies spécifiques du cancer. Au cours de la dernière décennie, l'introduction et le perfectionnement des technologies de criblage rapide à haut débit des molécules pharmacologiques a grandement facilité les découvertes de ces drogues anti-cancer spécifiques et leurs exploitations cliniques futures.

Ici, nous décrivons la découverte et le développement des deux molécules de synthèse: Sorafenib (connu sous le nom de Nexavar) et Lapatinib (connu sous le nom de Tykerb) qui ciblent respectivement les cancers du rein ou du foie et le cancer du sein.

2.5.1. Vers la découverte et le développement de Sorafenib

Les cancers de type Hépatocarcinomes constituent la grande majorité des cancers primitifs du foie (85-90%) (El-Serag et al, 2007). À l'échelle mondiale, le cancer primitif du foie est le cinquième plus courant. Et il se place en troisième sur l'échelle des cancers virulents qui n'ont autre finalité que la mort du patient (El-Serag et al, 2007). Ce qui poussa à la découverte et au développement de thérapies anti-cancer plus ciblées telles que le Sorafenib.

2.5.2. Mécanisme d'action et Cibles cellulaires du Sorafenib

Le Sorafenib est une molécule de type urée biaryl et dont l'administration se fait par voie orale. C'est un inhibiteur de multiples kinases qui inhibe à la fois les récepteurs de type tyrosine kinase situés à la surface des cellules et les sérines / thréonines kinases intracellulaires situées en aval dans la cascade de signalisation Ras / MAPK (Adnane et al, 2005; Wilhelm et al, 2006 ; Wilhelm et al, 2004). Les récepteurs tyrosine kinases inhibés par le Sorafenib comprennent le récepteur facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR -1, VEGFR-2, VEGFR-3), le récepteur au facteur de croissance des plaquettes (PDGFR-b), le récepteur au facteur de croissance des cellules souches (c-KIT), le récepteur au facteur de croissance des cellules immunes (FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) et le récepteur aux facteurs neurotrophiques RET. Les isoformes de la kinase sérine / thréonine Raf intracellulaire et qui sont inhibées par le Sorafenib comprennent Raf-1 (ou C-Raf) qui est une molécule de signalisation en aval de l'oncogène Ras, Raf de type sauvage B et le mutant B-Raf. (Wilhelm et al, 2006 ; Wilhelm et al, 2004). Ces dernières sont impliquées dans la prolifération des cellules de la tumeur et l'angiogenèse tumorale (Wilhelm et al, 2006 ; Wilhelm et al, 2004).

2.5.3. L'activité anti-tumorale in vitro et modèle animal

In vitro, l'inhibition dose-dépendante de la prolifération cellulaire a été observée avec le Sorafenib dans les lignées de cellules PLC / PRF / 5 et HepG2 issues de carcinomes hépatocellulaires humains (Liu et al, 2006). L'utilisation du Sorafenib sur les lignées PLC / PRF / 5 et les lignées HepG2 inhibe la viabilité d'environ 50% des cellules tumorales. Il faut noter que l'action inhibitrice du Sorafenib sur

la voie de signalisation Raf / MEK / ERK dans les cellules HepG2 et PLC/PRF-5 fut montrée, entre autre chose, par l'inhibition de la phosphorylation de MEK et ERK (Liu et al, 2006).

De plus, le Sorafenib a démontré une activité anti-tumorale dose-dépendante dans le modèle de xénogreffe murin ayant développé des hépatocarcinomes d'origine humaine (Liu et al, 2006). Les expérimentateurs ont, entre autre, observé une régression tumorale partielle mais durable chez 50% des souris ayant reçu le Sorafenib (Liu et al, 2006). Dans ce modèle de xénogreffe murin, le Sorafenib, à une dose de 30 ou 100 mg / kg / jour pendant 5 jours, inhibait l'angiogenèse tumorale, la cascade de signalisation Raf / MEK / ERK (illustré par une réduction de la phosphorylation de ERK) et l'apoptose induite (Liu et al, 2006).

2.5.4. Des cas de résistance

L'incidence croissante du carcinome hépatocellulaire (HCC) est d'une grande préoccupation partout dans le monde. Bien que le Sorafenib semble être efficace pour prolonger la durée moyenne de survie des patients atteints d'hépatocarcinome (HCC) et avec un minimum d'effets collatéraux, il peut, néanmoins, causer une résistance chez certains patients. Des études menées au sein de lignées cellulaires Huh7 rendues résistantes, par exposition chronique à des doses minimales de Sorafenib, ont révélé un rôle majeur de la voie de signalisation PI3K/Akt dans ce phénomène de résistance chimiothérapeutique. La voie PI3K/Akt est impliquée dans les mécanismes de l'apoptose. Quand cette voie est activée, l'apoptose est réduite et la prolifération cellulaire augmente. Dans cette cascade de signalisation, des facteurs de pro-survie se fixent au récepteur tyrosine kinase, ce qui active la kinase PI3K. Ainsi activée, la kinase PI3K initie des signaux de transduction qui mènent à la phosphorylation d'Akt, ce qui inhibe l'apoptose. Ainsi, dans les modèles cellulaires proposés par les expérimentateurs, il a été observé une surrégulation d'Akt et une insensibilité des cellules d'HCC au Sorafenib (Chen et al, 2011). Cette sensibilité pouvait être restaurée en inhibant

par ARN interférence ou par inactivation pharmacologique, la protéine Akt (Chen et al, 2011).

2.5.5. Vers un lien avec les granules de stress?

Le (s) mécanisme (s) par lequel le Sorafenib pourrait initier les mécanismes de résistance cellulaire sont encore peu connus. Rahmani et collaborateurs ont montré que le Sorafenib pouvait médier la mort cellulaire dans les cellules leucémiques humaines à travers un mécanisme de signalisation indépendant de MEK1/2-ERK1/2. De manière significative, les auteurs de cette étude ont montré que le Sorafenib induisait le « ER-Stress » ou stress du réticulum endoplasmique. Ceci se manifestant par une mobilisation rapide du calcium cytoplasmique qui, libéré à partir du réticulum endoplasmique, peut induire plusieurs événements pro-apoptotiques (Bernardi, 1999; Xu et al, 2005), l'activation de PKR-like ER kinase (PERK) responsable de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 (eIF2) qui induit l'inhibition de la traduction des protéines (Rahmani et al, 2007). Or, la phosphorylation du facteur eIF2 est un événement clé de la formation des GS. D'une manière générale cette étude offre un concept nouveau pour la compréhension du mécanisme d'action du Sorafenib comme un agent potentiellement inducteur d'une réponse cellulaire au stress qui pourrait se manifester par la formation des granules de stress.

2.6. Lapatinib

2.6.1. Vers la découverte et le développement de Lapatinib

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent (23% de tous les cancers), ainsi que la principale cause de mortalité liée au cancer (14% de tous les décès dû au cancer), chez les femmes à travers le monde (Parkin et al, 2002). Environ 20 à 25% des femmes ont un sous-type de cancer du sein caractérisé par la surexpression du récepteur au facteur de croissance épidermique de type 2 humain (HER2; également appelé ErbB2), une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine kinase (McArthur et al, 2009 ; Moy et al, 2007 ; Nahta et al, 2006). La mise en évidence du fait que les tumeurs surexprimant HER2 (ou HER2-positif) ont un moins bon pronostic que celles ne surexprimant pas HER2, a conduit à la mise au point d'agents inhibiteurs ciblant 'spécifiquement' HER2 tels que le Trastuzumab. Ces inhibiteurs sont conçus pour bloquer les voies de signalisation de HER2 et ainsi améliorer les résultats thérapeutiques chez les patients atteints de ces cancers (McArthur et al, 2009 ; Spector et al, 2007 ; Geyer et al, 2006). Cependant, l'efficacité du Trastuzumab est limitée et présente des cas de chimiorésistance. Il devenait donc essentiel de développer des stratégies anti-HER2 alternatives aux cancers résistants au Trastuzumab (Bartsch et al, 2007; McArthur et al, 2009 ; Spector et al, 2007 ; Geyer et al, 2006).

2.6.2. Cibles cellulaires de Lapatinib et Mécanisme d'Action

Le Lapatinib (Tyverb, Tykerb) est un double inhibiteur de récepteur de type tyrosine-kinases qui ciblent les membres de la famille de récepteurs aux facteurs de croissance épidermique EGFR (également appelé HER1 ou ErbB1) et HER2

(McArthur et al, 2009 ; Spector et al, 2007 ; Dhillon et al, 2007 ; Nielsen et al, 2009 ; Bilancia et al, 2007). Comment agit-il ? Le Lapatinib entre en compétition avec l'ATP (adénosine triphosphate) pour se fixer, à la place de l'ATP, sur son site de liaison situé au niveau des domaines intracellulaires tyrosine-kinase des deux récepteurs EGFR et HER2, empêchant ainsi l'utilisation de l'ATP comme cofacteur pour la phosphorylation de la tyrosine, qui est une étape importante lors de l'activation du récepteur (Montemurro et al, 2007 ; Johnston et al, 2006). Le Lapatinib est une molécule qui s'administre par voie orale (Lin et al, 2004). Cette molécule a démontré un bénéfice clinique chez les patientes surexprimant HER2, chez les patientes souffrant de cancer du sein réfractaire avancé ou métastatique et qui ont déjà, toutes, été exposées à des traitements standards de chimiothérapie et/ou le Trastuzumab (Iwata et al, 2006 ; Blackwell et al, 2009 ; Johnston et al, 2009; Kaufman et al, 2009). Le Lapatinib est actuellement à l'étude comme traitement de première ligne pour les cancers « HER2-positif » du sein de stade avancé ou métastatique, et comme traitement adjuvant du cancer « HER2-positif » du sein de un stade précoce, (Moy et Goss, 2006 et 2007). Ainsi, en Mars 2007, le Lapatinib monohydraté distosylate (Tykerb, GlaxoSmithKline) a été approuvé par la FDA comme complément de traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé ou métastatique de type « HER2-positif ». Il est approuvé pour une utilisation dans plus de 70 pays à travers le monde.

2.6.3. Activité anti-tumorale

In vitro, le Lapatinib inhibe puissamment et de manière réversible l'activité de la tyrosine kinase de récepteurs EGFR et HER2 (Rusnak et al, 2001) ; bloquant ainsi l'activation de leurs effecteurs respectifs situés en aval; soit des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK [ERK1 / 2]), qui sont impliqués dans

les voies de la prolifération cellulaire et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / AKT, qui est impliqué dans les voies de survie (Xia et al, 2002). Ceci conduit à un arrêt de croissance et / ou de l'apoptose dans les lignées cellulaires tumorales EGFR et HER2-dépendants (Rusnak et al, 2001 ; Wood et al, 2004 ; Xia et al, 2002). Différentes études suggèrent que l'activité in vitro de Lapatinib a été reproduit in vivo dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines (Rusnak et al, 2001 ; Xia et al, 2002). Lapatinib est présentement utilisé en clinique pour traiter les cancers du sein dits « HER2-positif » et qui ne répondent pas à l'Herceptin (Trastuzumab)

2.6.4. Des cas de résistance

Plusieurs essais de phase II ont montré que seulement 20% à 35% des patients atteints d'un cancer du sein « HER2-positif » métastatique répondent à Lapatinib (Gomez et al, 2008 ; Vasquez-Martin et al, 2009). Similaire au Trastuzumab, la durée moyenne de la réponse au traitement avec Lapatinib est inférieure à un an (Vasquez-Martin et al, 2009 ; Blackwell et al, 2009). Ainsi, la compréhension de la résistance cellulaire au Lapatinib est d'un enjeu vital. Toutefois, les mécanismes de sensibilité aux médicaments et la résistance acquise ne sont pas pleinement compris à date. Ainsi, dans un modèle in vitro, il fut découvert que la résistance au Lapatinib des cellules BT474 tumorales du sein étaient en partie médiée par une surrégulation des récepteurs aux oestrogènes (ER) et des récepteurs à la progestérone (PR), corrélé à une activité accrue des facteurs de survie FOXO3a et la cavéoline-1, ainsi que de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Xia et al, 2006). Fait intéressant, dans l'étude de Jegg et al, 2012, malgré l'inactivation apparente de la voie de signalisation PI3K/Akt (impliquée dans les mécanismes de survie cellulaire), les cellules résistantes au Lapatinib montrent une activation constitutive de mTORC1. Ces données démontrent un rôle pour l'activation en aval de mTORC1 en l'absence d'altérations moléculaires et conduisant à une hyperactivation de la voie PI3K/Akt, représentant ici, un mécanisme potentiel de résistance au Lapatinib dans ce modèle de cancer du sein ERBB2+.

2.6.5. Vers un lien avec les GS?

L'un des évènements clés de la réponse cellulaire au stress et de la formation subséquente des granules de stress passe par le mécanisme de phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . En 2013, l'étude de West et al montre que les traitements conjoint des lignées cellulaires de cancer du sein (MDA-MB-231 et BT474) avec le Lapatinib et OSU-03012 (une petite molécule inhibitrice de la Cox-2 dérivée de la drogue celecoxib) a induit des effets cytotoxiques / cytostatiques synergiques. Cette combinaison thérapeutique mène à une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α sur la serine51. Dès lors, l'expression ectopique de mutants eIF2 α non phosphorylables (Ser51Ala) ou la régulation négative d'eIF2 α en plus de la régulation négative de la kinase PERK qui phosphoryle eIF2 α vont inhiber les effets synergiques et cytotoxiques. Aussi, l'état de phosphorylation d'eIF2 α a été utilisé dans cette étude comme un indicateur de stress du Réticulum Endoplasmique. Étonnamment, le traitement des cellules cancéreuses du sein avec OSU-03012 ou Lapatinib entraîne une faible phosphorylation du facteur eIF2 α . Par contre, la phosphorylation de cette protéine est augmentée de façon significative après le co-traitement par Lapatinib et OSU-03012. Collectivement, ces résultats permettent d'envisager le Lapatinib comme l'inducteur potentiel d'une réponse cellulaire au stress qui s'illustrerait à travers l'inhibition de la traduction et la formation de granules de stress et ceci, dans un contexte de résistance cellulaire cancéreuse. Ainsi, les données de la littérature nous montrent que Lapatinib, Sorafenib ou Bortezomib peuvent moduler la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (West et al, 2013; Liu et al, 2011 ; Fournier et al, 2010). Cet état de phosphorylation est un mécanisme clé de la régulation de la Traduction. De plus, ces trois agents chimiothérapeutiques sont impliqués dans la régulation de

l'initiation de la traduction (Rahmani et al, 2007; Fournier et al, 2010; Liu et al, 2011). Et l'inhibition de la traduction est un évènement qui peut-être concomitant à la formation des GS. De plus, de nombreux travaux ont montré que des altérations dans le contrôle de la traduction sont souvent associées à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses. Par exemple, des études ont démontré qu'une expression aberrante des facteurs d'initiation de la traduction de la famille des eIFs (eIF4E, eIF4A, eIF2, eIF4G et eIF3) corrélait avec le développement des cancers (Dua et al, 2001 ; Watkins et Norbury, 2002).

3. TRADUCTION & CANCER

3.1. L'initiation de la traduction : Généralités

La traduction, communément appelée synthèse protéique, fait intervenir une pléiade d'acteurs (Pain VM., 1996). Que ce soit des facteurs de la traduction, les sous-unités ribosomales, des ARN de transfert (ARNt) et autres molécules qui sont impliqués, comme nous le verrons, dans les trois phases distinctes (initiation, élongation et terminaison) qui constitue le mécanisme de la traduction. L'exploration des mécanismes qui gouverne la traduction a pris son essor au cours de ces dix dernières années (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Il existe plusieurs types de mécanismes de la traduction. Le plus connue est la traduction dite dépendante de la coiffe. Néanmoins, il existe aussi un mécanisme de traduction médié par les IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Thakor et Holcik, 2012; Komar et Hatzoglou, 2011) et par le CBC-CTIF-RHA (Gonatopoulos-Pournatzis et Cowling, 2013; Sharma et al, 2012; Garre et al 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous ne parlerons que de la traduction coiffe-dépendante et dépendante d'eIF4E.

Chez les cellules eucaryotes, la traduction se résume à trois étapes majeures : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la traduction est l'étape durant laquelle les sous-unités ribosomiques s'assemblent sur l'ARNm et se positionnent sur le codon d'initiation. Ensuite, l'élongation correspond à la formation du complexe d'initiation, à la lecture de l'ARNm et à la synthèse de la protéine, par ajout successif d'acides aminés au peptide en cours de synthèse. Enfin, l'étape de terminaison qui survient quand le codon stop est atteint par le ribosome. A ce moment-là, le ribosome se détache de la protéine et du brin

d'ARNm et la protéine est libérée dans le cytoplasme de la cellule. Au final, la protéine produite peut, en plus, subir des modifications post-traductionnelles. Celles-ci vont modifier la conformation, la localisation, la stabilité ou l'activité même de la protéine. Les modifications les plus courantes sont la phosphorylation (Sefton et Shenolikar, 2001), l'ubiquitination (Hershko, 2005), la glycosylation (Weerapana et Imperiali, 2006) et la sumoylation (Guo et al, 2007). Le contrôle efficace de la traduction des ARNm permet une modulation rapide de la quantité de protéines dans un contexte spatio-temporel, à l'échelle de la cellule et des tissus. Bien que des contrôles puissent s'appliquer à chacune de ces trois phases, l'initiation de la traduction est une phase régulatrice primordiale de la synthèse protéique (Sonenberg et Hinnebusch, 2009).

3.2. Mécanisme de l'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est subdivisée en différentes sous-étapes dont : 1- la formation du complexe ternaire ; 2- la formation du complexe de pré-initiation 43S; 3- la formation du complexe de pré-initiation 48S; et 4- la formation du ribosome fonctionnel 80S.

3.2.1. Formation du complexe ternaire et du complexe de pré-initiation 43S

L'initiation de la traduction commence par la formation du complexe ternaire eIF2.GTP.ARNtⁱ-Met. L'assemblage de ce complexe nécessite le recrutement d'un ARNt initiateur-méthionine (ARNtⁱ-Met) et d'une molécule de GTP par le facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Pain VM, 1996). Pour cela, le facteur échangeur de nucléotide guanidine (eIF2B) va substituer le GDP associé à eIF2 par un GTP. Ainsi, le facteur eIF2 est activé et il peut lier l'ARNt qui est chargé d'une méthionine.

Par la suite, ce complexe eIF2.GTP.ARNti-Met se lie à la sous-unité 40S du ribosome (Kapp et Lorsch 2004). Cette interaction est stabilisée par l'association avec les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF5 et eIF3 (Das et al, 1997 ; Asano et al, 1999). Et ceci donne naissance au complexe de pré-initiation 43S. (Figure 7)

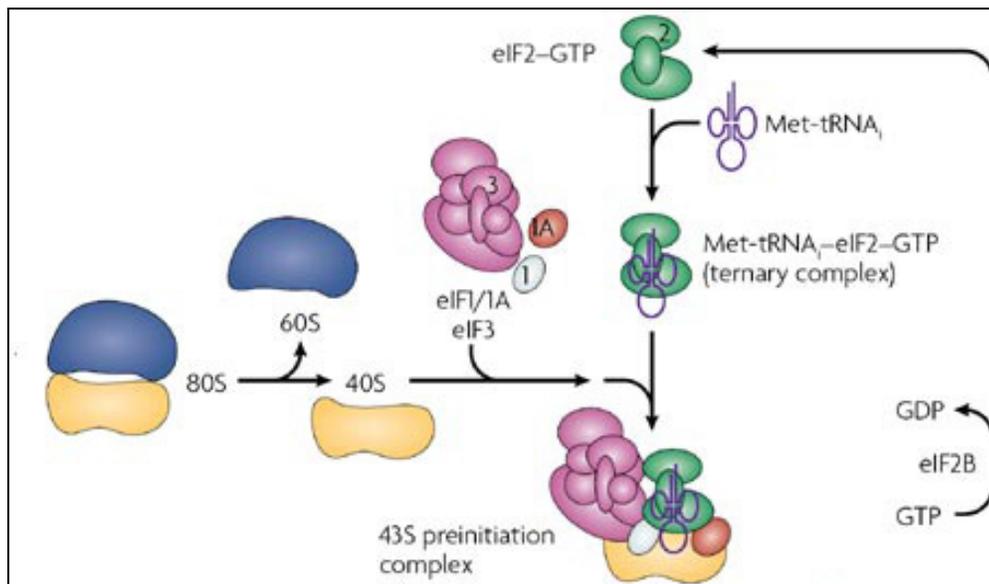


Figure 7. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe de l'ARNm chez les eucaryotes. L'initiation de la traduction commence avec la formation du complexe ternaire eIF2.GTP.ARNti-Met ; son association subséquente à la sous-unité ribosomale 40S, permet la formation du complexe de pré-initiation 43S. (Adapté de Fraser et Doudna, 2007)

3.2.2. Formation du complexe de pré-initiation 48S

En parallèle, le complexe eIF4F (composé d'eIF4E, eIF4GI et de l' hélicase à ARN nommée eIF4A) va reconnaître la structure coiffe de l'ARNm et « défaire » les structures secondaires en épingle à cheveux (hairpin) de la région 5'UTR avec l'aide de 2 chaperones à ARN, les facteurs eIF4B et eIF4H (Richter-Cook, Dever et al, 1999; Rogers et al, 1999, Rogers et al, 2001). eIF4E est responsable de la reconnaissance précoce des ARNm en se liant à la structure coiffe 5'-m7GpppN de l'ARNm (Sonenberg et al, 1978) (Figure 7).

Au préalable, le facteur eIF4E est rendu disponible pour assurer sa fonction suite à sa dissociation d'avec 4E-BP1. En effet, la kinase mTOR phosphoryle 4E-BP1 qui, ainsi hyperphosphorylé, perd son affinité pour eIF4E. eIF4E est ainsi disponible pour s'associer à son autre partenaire de liaison, bien connu, eIF4GI (Figure 8) (Jackson et al, 2010; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). L'interaction d'eIF4E avec la coiffe de l'ARNm est renforcée par le facteur d'initiation de la traduction eIF4GI. C'est ainsi que le complexe de pré-initiation 43S est ensuite recruté à l'ARNm et se lie à la coiffe de l'ARNm avec l'aide du complexe eIF4F et de la protéine de liaison à la queue polyA ou PABP (poly-A binding protein). Ceci donne naissance au complexe de pré-initiation 48S.

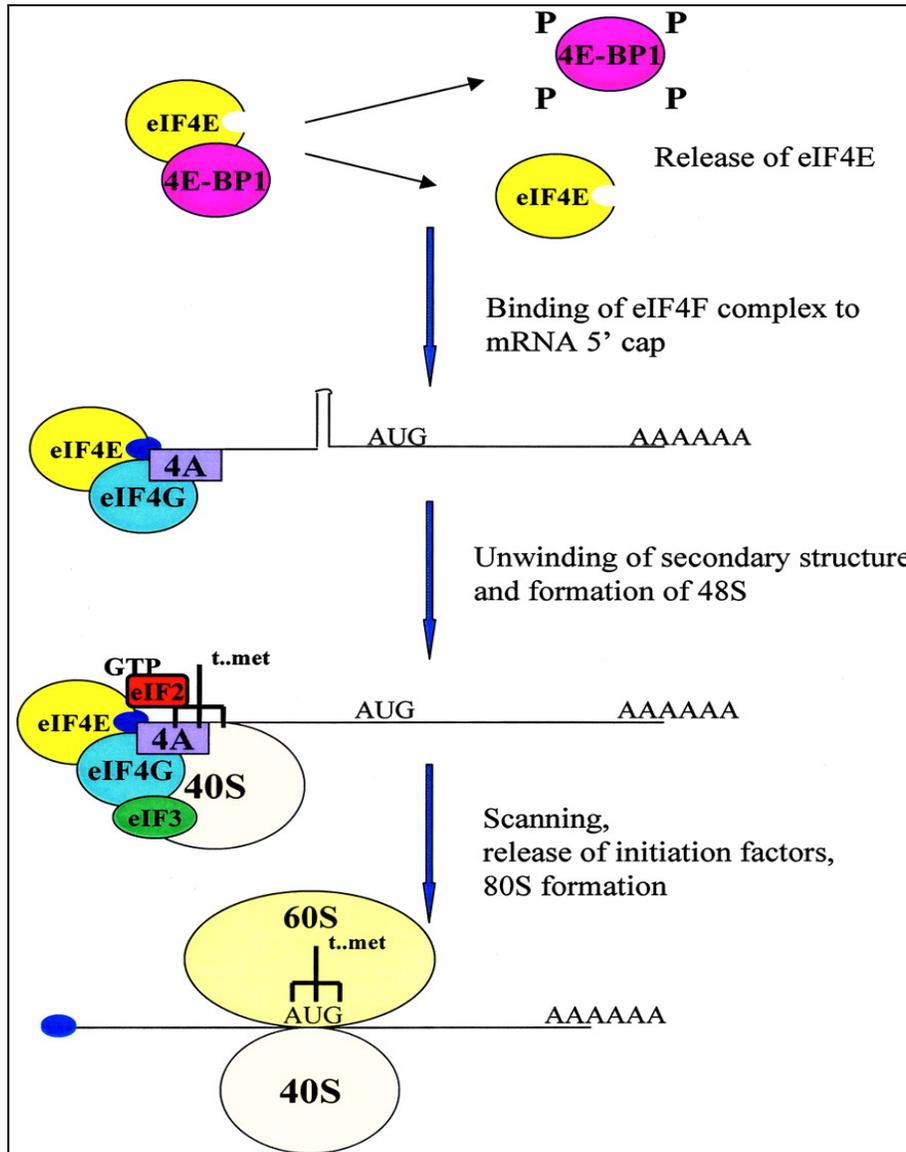


Figure 8. Zoom sur l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe de l'ARNm. Les facteurs 4E-BPs vont être phosphorylés par la kinase mTORC1 afin de relâcher eIF4E de façon à ce qu'il puisse reconnaître la structure coiffe de l'ARNm située en 5' UTR. Ceci amène au recrutement des facteurs composant le

complexe eIF4F. Une fois assemblé, le complexe d'Initiation eIF4F va se fixer/stabiliser sur la coiffe de l'ARNm. L'interaction de PABP avec le complexe d'Initiation et la circularisation de l'ARNm ne seront pas décrites dans ce schéma. La structure secondaire située en 5' UTR sera défaits. La petite sous-unité ribosomale 40S fixée au facteur eIF3 et le complexe ternaire (constitué de eIF2, du GTP et du Met-tRNA) est par la suite recruté à l'ARNm. Le complexe ribosomal va scanner l'ARNm dans la direction 5'UTR → 3'UTR jusqu'à trouver le codon start AUG. Les facteurs d'initiation sont relargués et la grande sous-unité ribosomale est recrutée. L'étape d'élongation peut commencer. (Adapté de Meric et Hunt, 2002)

3.2.3. Formation du ribosome fonctionnel 80S

La formation du complexe de pré-initiation 48S est soutenue par la présence d'eIF4E (Sonenberg et al, 1978), qui est associé à la protéine d'échafaudage eIF4GI. L'interaction entre eIF4GI et eIF3 va stabiliser le complexe de pré-initiation 43S (Fraser et al. 2004; Valasek et al. 2004), permettant ultimement de le mener vers le codon AUG star de l'ARNmt. Lors de l'appariement de l'anticodon Met-tRNAi et le codon start AUG, eIF2 va hydrolyser son GTP avec l'aide de la GTPase, eIF5 (Algire et al, 2005). Suite à l'hydrolyse du GTP, le complexe eIF2-GDP se dissocie du complexe ribosomale 40S pour être recyclé et réutilisé lors d'un nouveau cycle de traduction. Finalement, une seconde GTPase, le facteur eIF5B, va promouvoir l'association de la sous-unité 60S à la sous-unité 40S (Acker et al., 2006) pour former le complexe d'initiation 80S compétent pour la traduction tout en révoquant les facteurs d'initiations restants et qui entraveraient le processus de synthèse protéique.

Il faut noter que l'échange du GDP pour GTP par le facteur eIF2B est hautement régulé dans les cellules eucaryotes. Cette régulation implique la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α par au moins l'une de ses 4 kinases spécifiques (PERK, PKR, GCN2 ou HRI) (Figure 9). Il est à noter que le facteur

eIF2 peut être inhibé suite à certains stress environnementaux (Holcik et Sonenberg, 2005; Wek et al, 2006).

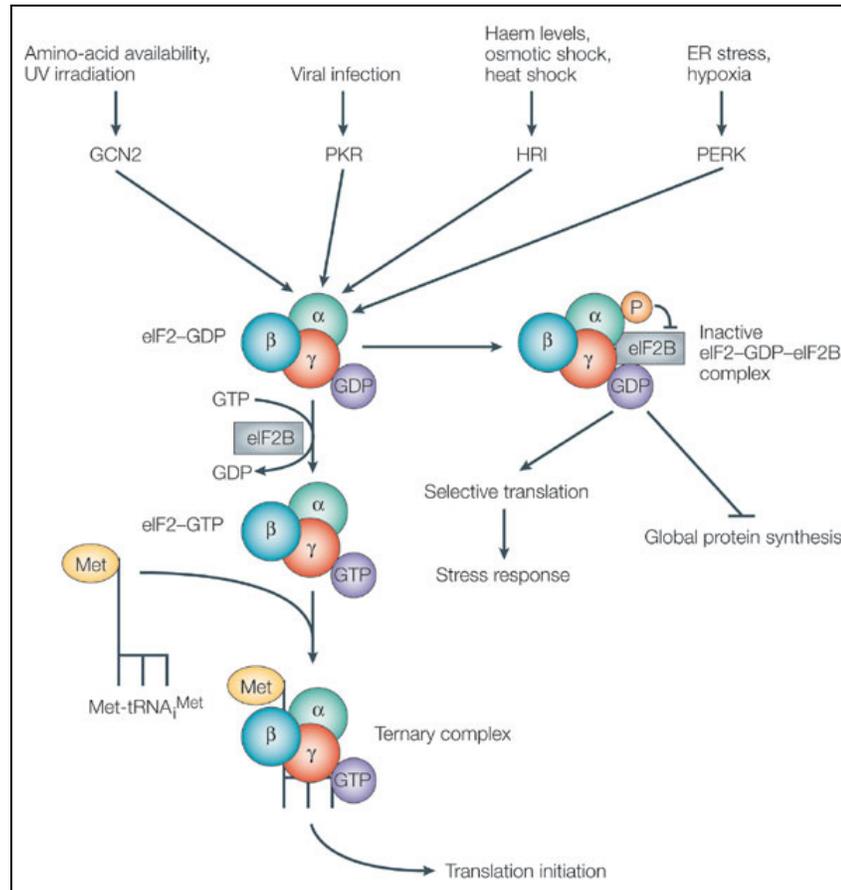


Figure 9. Contrôle de la traduction par le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et ses kinases associées. eIF2 fixé au GDP (eIF2-GDP) est changé en un complexe actif de type eIF2-GTP par réaction de catalyse, à l'aide du facteur eIF2B. Ensuite, le complexe eIF2-GTP va former un complexe ternaire avec le Met-tRNA_i et la petite sous-unité ribosomale 40S ; résultant ainsi en un complexe de pré-initiation 43S. Il faut noter que quatre kinases sont capables de phosphoryler la serine 51 de la sous-unité α du facteur eIF2 et ainsi permettre la

stabilisation sous la forme inactive du complexe eIF2-GDP-eIF2B et empêcher sa réutilisation pour un autre tour de traduction. Ces kinases sont HRI, PKR, PERK/PEK et GCN2. Ces évènements mènent généralement à une inhibition de la traduction et subséquemment, à l'apparition de GS. (Adapté d'Holcik et Sonenberg, 2005)

3.4. La kinase HRI

HRI (heme-regulated initiation factor 2 α ou heme regulated inhibitor of translation) fut découverte dans les réticulocytes comportant des carences en Fer et en Hème. Ces carences provoquaient, entre autre, l'inhibition de la synthèse des protéines à l'étape de l'initiation et la désagrégation des polysomes (Waxman et al, 1965 ; Grayzel et al, 1966 ; Zucker et al, 1968 ; Legon et al, 1973). Plus tard, HRI fut montré comme étant la kinase qui phosphorylait la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Levin et al, 1976 ; Kramer et al, 1976; Wek et al, 2006), un facteur clé de l'initiation de la traduction. Aussi, HRI (aussi connue sous le nom d'EIF2AK1) peut s'activer dans le contexte de stress osmotique, le choc thermique (Lu et al, 2001) et le stress oxydatif produit par l'Arsenite (McEwen et al, 2005). Plus récemment, notre laboratoire a mis en évidence l'intervention de HRI pendant l'inhibition du protéasome des cellules cancéreuses induite par l'agent chimiothérapeutique Bortezomib (Fournier et al, 2010).

3.4.1. Structure d'HRI

Des études biochimiques ont démontré que HRI a 2 types distincts de sites liaison à l'hème (Chefalo et al, 1994). HRI a aussi 3 régions uniques, le domaine N-terminale, le domaine « insert kinase » (KI), et l'extrémité C-terminale. Tant l'extrémité N-terminale que le domaine KI peuvent se lier l'hème, tandis que les domaines catalytiques de la kinase (I kinase, kinase II) et la région C-terminal ne

peuvent pas (Rafie-Kolpin et al, 2000). En outre, l'extrémité N-terminale est absolument nécessaire pour assurer la fixation stable, avec une haute affinité, de l'hème, et est également indispensable à l'activité kinase phosphorylant eIF2 α (Figure 10) (Rafie-Kolpin et al, 2000).

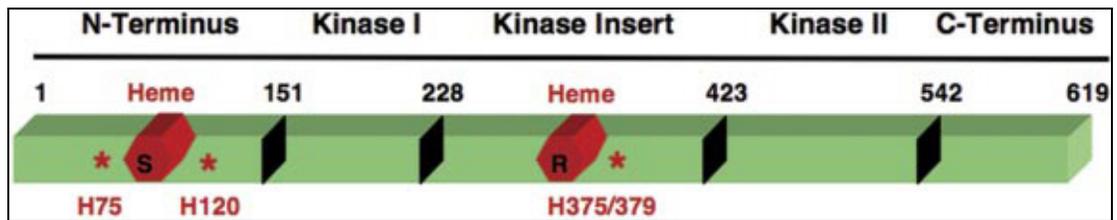


Figure 10. La structure de la protéine HRI. HRI est divisé en 5 domaines comme vu sur ce schéma. La séquence d'acides aminés de souris de HRI. est utilisé ici. Les lieux de fixation des molécules d'hème sont marqués en rouge. Le S désigne le site liaison stable pour l'hème, tandis que R désigne le site de liaison à l'hème qui est réversible. *, les étoiles sont les résidus d'histidine présents pour coordonner la fixation de la molécule d'hème sur HRI. (Adapté de Chen JJ, 2007)

3.4.2. Etats d'activation de la Kinase HRI

Des études biochimiques (révisés dans Chen JJ, 2007) ont conduit à proposer que, dans un contexte de déficience en hème, HRI ayant incorporé de l'hème au niveau de son domaine N-terminal, dimériserait rapidement et déclencherait son autophosphorylation multiple (Gross et al, 1978 ; Fagard et al, 1981 ; Chefalo et al, 1994 ; Bauer et al, 2001 ; Lu et al, 2001) selon un mode en 3 étapes (Bauer et al, 2001; Rafie-Kolpin et al, 2000; Rafie-Kolpin et al, 2003) (Figure 11). Ce processus aboutit à la formation d'un homodimère d'HRI stable et actif stable.

L'activation de HRI serait donc due à un changement conformationnel imposé par le stress.

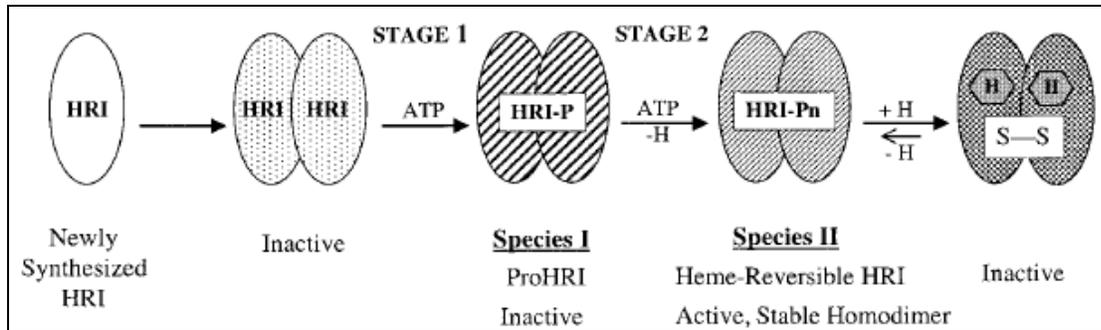


Figure 11. Modèle de formation de l'homodimère actif et stable d'HRI, par étape d'autophosphorylation multiple. La protéine kinase HRI doit passer par plusieurs étapes avant d'être activée : une étape d'homodimérisation suivi d'autophosphorylations se déroulant selon un mode séquentiel (Adapté de Bauer et al, 2001).

3.4.3. Fonctions connues d'HRI

HRI a été le premier membre de la famille des « eIF2 α kinases » à être découvert, comme étant impliqué dans le contrôle l'initiation de la traduction en conditions de stress. Ce contrôle passe par la phosphorylation de la α -sous-unité de eIF2 (eIF2 α P) (Chen et al, 2007 ; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Mais au départ, la fonction initiale d'HRI réside dans sa capacité à moduler la réponse au stress induite par la déficience de l'hème dans les globules rouges. En effet, HRI est nécessaire pour coordonner la traduction des ARNm de globine en fonction de la disponibilité de l'hème afin d'assurer la production de grandes quantités d'hémoglobine pendant la maturation érythroïde (Han et al, 2001). HRI agirait aussi comme un senseur de la concentration de l'hème intracellulaire. Aussi, HRI fut qualifié d'inhibiteur traductionnel dans le contexte de déficience en hème dans

les réticulocytes (Crosby et al. 2000) ; ce qui va corrélérer avec l'activation de la kinase HRI (Clemens, 1996; Chen, 2000, Han et al, 2001).

De plus, l'étude de Crosby et al, a identifié une élévation du nombre d'ARNm d'HRI pendant le phénomène de différenciation érythroïde des cellules de souris érythroleucémiques (Crosby et al, 1994). Ce résultat met indirectement en valeur un rôle prépondérant d'HRI dans les mécanismes de régulation de l'expression génique. Il faut aussi noter que l'ARNm d'HRI tout comme sa protéine sont aussi détecté dans les cellules non érythroïdes (Berlanga et al, 1998). Ainsi, HRI semble également avoir un rôle dans d'autres types cellulaires que les globules rouges. Par exemple McEwen et al ont démontré l'effet cyto-protecteur de la kinase HRI en condition de stress oxydatif. Les chercheurs ont utilisé des fibroblastes de souris n'exprimant pas HRI. Ils ont soumis ces cellules à un traitement avec l'arsenite. Leurs résultats ont alors mis en évidence l'importance de la kinase de stress HRI et de la phosphorylation d'eIF2 α dans la formation des GS (McEwen et al. 2005). De plus, HRI serait aussi impliquée dans le mécanisme de survie cellulaire de ces fibroblastes stressés mais aussi des souris soumises au même stress oxydatif. Ces résultats sont toutefois contestés par des expériences contradictoires, utilisant également des fibroblastes de souris dépourvus de HRI, non publiées mais dont les résultats sont accessibles sur le site du laboratoire de David Ron.

(<http://saturn.med.nyu.edu/research/mp/ronlab/Postings/HRI&As.html>)

Par ailleurs, les travaux de Ghisolfi et al, ont mis en évidence un rôle de majeur HRI dans la différenciation des cellules sanguines. En effet, HRI, par le biais de la phosphorylation d'eIF2 α , régulerait l'assemblage des GS qui peut se produire même spontanément au sein des cellules érythroïdes en différenciation. Ce qui, de surcroît, promeut la survie cellulaires de ces cellules en différenciation. (Ghisolfi et al, 2012). Ainsi, HRI est capable d'assurer un rôle cyto-protecteur en

condition physiologique et de stress cellulaire. Enfin, divers travaux ont révélé HRI comme étant un facteur non seulement nécessaire dans la réponse cellulaire au stress des cellules non érythroïdes (Yerlikaya et al, 2008), mais aussi pour la formation des GS en condition de stress dans les cellules cancéreuses (Fournier et al, 2010). Nos investigations ont d'ailleurs montré que la déplétion de HRI sensibilise les cellules cancéreuses à la mort cellulaire en réponse au Bortezomib, en partie en supprimant la formation des GS (Fournier et al, 2010).

3.5. Acteurs clés de l'initiation de la traduction

3.5.1. Le facteur eIF4E

Le facteur eIF4E présente un poids moléculaire de l'ordre de 24-25 kDa. eIF4E est une famille de protéines chez laquelle trois sous-familles peuvent être distinguées chez les mammifères (Joshi et al, 2005). Nous retrouvons eIF4E1, eIF4E2 (appelée également 4E-HP, 4E-SL) et eIF4E3. Faisant fonction dans le cytoplasme, de plus en plus d'études montrent qu'une fraction significative d'eIF4E (jusqu'à 68%) (Iborra et al, 2001) est observée dans le noyau.

➤ Structure

Structurellement parlant, eIF4E ressemble à une main incurvée dont la face concave est le réceptacle dans lequel la coiffe de l'ARNm vient se fixer (Tomoo et al, 2003). En fait, les protéines 4E-BP et eIF4G ont la possibilité d'occuper la même poche sur la surface dorsale convexe d'eIF4E, dans laquelle on retrouve le résidu W73 d'eIF4E, essentiel pour l'interaction d'eIF4E avec eIF4G et 4E-BP (Figure 12) (Mader et al, 1995; Matsuo et al, 1997).

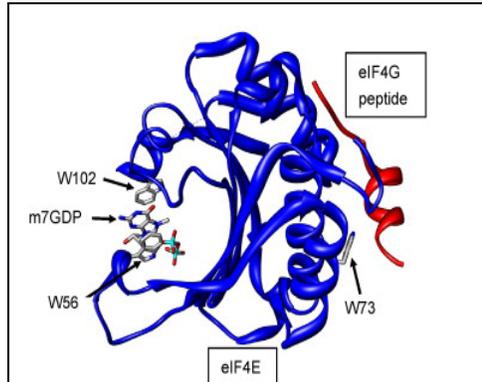


Figure 12. Schématisation d'eIF4E et ses sites de liaisons à la coiffe et eIF4GI. eIF4E a une structure assez conservée qui se caractérise par un feuillet β composé de 8 brins antiparallèles, au-dessus de 3 hélices α formant une forme en gant de baseball. Deux résidus tryptophane (Trp56 et Trp102 pour l'eIF4E humain), localisés au niveau d'une cavité étroite sur la surface concave, permettent de tenir le résidu guanine de la coiffe grâce à des interactions non covalentes entre les cycles aromatiques et la coiffe, qui s'intercale entre les deux cycles. Ces interactions sont stabilisées par la formation de liaisons hydrogènes entre le Trp 102 et le résidu conservé Glu (Glu 103 pour eIF4E1 humain). (Adapté de GoodFellow et Roberts, 2008)

➤ **Fonction**

Le facteur eIF4E est le point de contrôle majeur dans l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. Il régule notamment la liaison de la petite sous-unité ribosomale 40S à la coiffe méthylée (m7G) située sur l'extrémité 5' de l'ARNm (Sonenberg et Pause, 2006). Cette interaction directe d'eIF4E avec la coiffe (Filopowicz et al, 1976 ; Sonenberg et al, 1978) est particulièrement importante pour la fixation de l'ARNm sur la 40S. D'ailleurs, l'interaction du facteur eIF4E

avec le facteur eIF4G permet le recrutement du complexe de pré-initiation 43S sur l'ARNm et subséquemment la formation du complexe de pré-initiation 48S (Lamphear et al, 1995; Prevot et al, 2003). Initialement, eIF4E ait été identifié comme un facteur d'initiation de la traduction (Filopowicz et al, 1976; Sonenberg et al, 1978). De nombreuses études se sont focalisées sur cette fonction. Mais la fonction d'eIF4E s'avère plus complexe qu'un simple rôle commutateur de la traduction. eIF4E est maintenant considéré comme le pivot central dans le contrôle de plusieurs aspects de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Il jouerait un rôle dans l'export spécifique de certains ARNm (Rousseau et al, 1996; Culjkovic et al, 2005; Culjkovic et al, 2007; Topisirovic et al, 2009). De plus, eIF4E serait associé au processus de 'proofreading round' de la traduction (Iborra et al 2004). Mais le rôle d'eIF4E dans ces deux phénomènes est encore flou. eIF4E a aussi des propriétés oncogéniques. Ainsi, la surexpression d'eIF4E ne mène pas à une augmentation de la synthèse protéique de l'ensemble des ARNm (Rousseau et al, 1996b; Clemens and Bommer, 1999) mais de seulement certains transcrits impliqués dans le processus néfaste de la tumorigénèse (Survivin, ODC, VEGF, etc...) (pour revue : Gingras, Raught et Sonenberg, 1999 & Schmidt EV, 1999 ; Rosenwald et al, 1993; Shantz et al, 1994; Kevil et al, 1996; Zimmer et al, 2000; Li et al, 2001). Cette sensibilité a été attribuée au fait que ces transcrits portent en 5'UTR une séquence spécifique très complexe (Defatta et De Benedetti, 2003).

➤ **Régulation**

L'activité du facteur eIF4E est régulée par divers mécanismes tels que la phosphorylation sur la sérine 209 (Morley and Traugh, 1989; Rutgers et al, 1996; Wang et al, 1998 ; Tuazon et al, 1990; Whalen et al, 1996, Pyronnet et al, 1999; Waskiewicz et al. 1999; Pyronnet, 2000), la déphosphorylation (pour revue : Gingras AC, 1999) et la dégradation (Murata and Shimotohno, 2006). D'autre part, la disponibilité d'eIF4E dans les cellules est grandement régi par la liaison de celui-ci avec son partenaire appartenant à la famille 4E-BP. Généralement 4E-BP1 est l'interlocuteur principal d'eIF4E. Néanmoins, les autres isoformes

peuvent prendre le relais si nécessaire (ex : démontré dans les souris K.O pour 4E-BP1).

La régulation d'eIF4E passe aussi par un contrôle transcriptionnel (Jones et al, 1996; Schmidt, 2004 ; Zhu et al, 2005) et par sa régulation de sa localisation intracellulaire. En effet, si eIF4E est une protéine majoritairement cytoplasmique, une fraction de cette protéine est retrouvée au niveau du noyau. Néanmoins, eIF4E demeure actif dans le noyau. De plus, en période de stress cellulaire, eIF4E se localise également dans certaines structures cytoplasmiques qui sont les granules de stress (Kedersha et al, 2002) ; ce qui corrèle, aussi, avec l'inhibition de l'initiation de la traduction.

➤ **eIF4E et Oncogenèse**

Initiation de la traduction et Cancérogenèse

Généralement, les altérations dans le contrôle traductionnel sont souvent associées à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses (Dua K et al, 2001 ; Watkins et Norbury, 2002). Parmi la machinerie complexe de la traduction, le facteur eIF4E est une cible majeure de la régulation de l'initiation. Ce facteur d'initiation joue également un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire, et a été impliqué dans plusieurs mécanismes physiopathologiques dont celui de la tumorigenèse (Sonenberg et Gingras, 1998).

La surexpression d'eIF4E initie le processus de cancérogenèse

eIF4E joue le rôle d'un oncogène (Wang et al, 1999; Sonenberg, 2008) et participe à la genèse des tumeurs dans différents tissus lorsqu'il est surexprimé (Ruggero et al, 2004). Mais pas seulement. Même incompetent pour la traduction, eIF4E peut quand même influencer positivement la transformation des cellules. Dans le cancer du sein, l'activation d'eIF4E est déterminante (Anthony et al, 1996), non seulement pour initier la maladie, mais aussi pour sa progression (Avdulov et al, 2004) et favorise l'agressivité de la tumeur (Li et al, 1997). Les mécanismes exacts par lesquels eIF4E et le complexe eIF4F induisent la transformation oncogénique sont encore débattus.

Comment expliquer l'action d'eIF4E dans le processus de cancérogenèse ?

En analysant les profils des ARNm présents dans les polysomes, on remarque que la surexpression d'eIF4E induit la traduction de protéines anti-apoptotiques et impliquées dans la survie cellulaire comme la survivin, BCL2, AKT (Mamane et al, 2007). Aussi, la surexpression d'eIF4E active l'oncogène Ras et coopère avec l'expression des deux oncogènes: E1A et myc (Lazaris-Karatzas et al, 1992; Lazaris-Karatzas et Sonenberg, 1990). Ce qui nous amène à conclure que l'augmentation de la traduction d'un groupe d'ARNm impliqués dans des procédés cellulaires, tels que la prolifération, l'angiogenèse, ou la survie cellulaire pourrait être en partie responsable de la transformation cellulaire (Konicek et al, 2008; Silvera et al, 2010). Les ARNm potentiellement ciblés par cette régulation comprennent ceux codant pour certaines cyclines, ODC, CDK2, cMYC, Mcl-1, Bcl-2, VEGF, FGF2 or MMP9 (Clemens, 2004; Mamane et al, 2004; Hsieh and Ruggero, 2010). Ces transcrits ont de longues régions 5'UTR riches en G/C, qui forment des structures "hairpin" complexes nécessitant l'activité d'eIF4A pour permettre l'étape de balayage du 40S (Koromilas et al, 1992). Ces ARNm sont

appelés "ARNm faibles", parce qu'ils sont très peu traduits en conditions normales. Plusieurs travaux démontrent que ces ARNm aux structures secondaires complexes sont traduits plus efficacement en cas de surexpression d'eIF4E dans les cellules malignes (Mamane et al, 2007).

L'inhibition d'eIF4E altère le processus de cancérogenèse

La diminution du niveau protéique d'eIF4E par ARN interférence, inhibe la croissance de plusieurs lignées cellulaires, y compris celles du carcinome épidermoïde du cou et de la tête (Oridate et al, 2005). D'autre part, Graff et ses collègues ont montré que l'administration d'oligonucléotides antisens (ASOs) spécifiques à eIF4E réduit l'expression protéique d'eIF4E dans des xénogreffes de tumeurs humaines. Ceci permettant d'inhiber, de façon significative, la croissance tumorale (Figure 13). Néanmoins, pendant les phases d'essais cliniques, les ASOs anti-eIF4E n'ont pas fait leur preuve en termes d'efficacité thérapeutique (Lightfoot et Hall; 2012). Par contre l'agent Ribavirin, un analogue de la coiffe m7G, a été testé en essai clinique sur des patients souffrant de leucémie aïdue myéloïde (AML). Son efficacité est telle que parmi les onze patients testés, un patient a subi une complète rémission, deux ont eu une rémission partielle, quatre ont vu leur maladie se stabiliser (Assouline et al, 2009). Il s'agit, ici, de la première étude clinique à démontrer eIF4E comme une cible thérapeutique légitime, dans le contexte de l'AML.

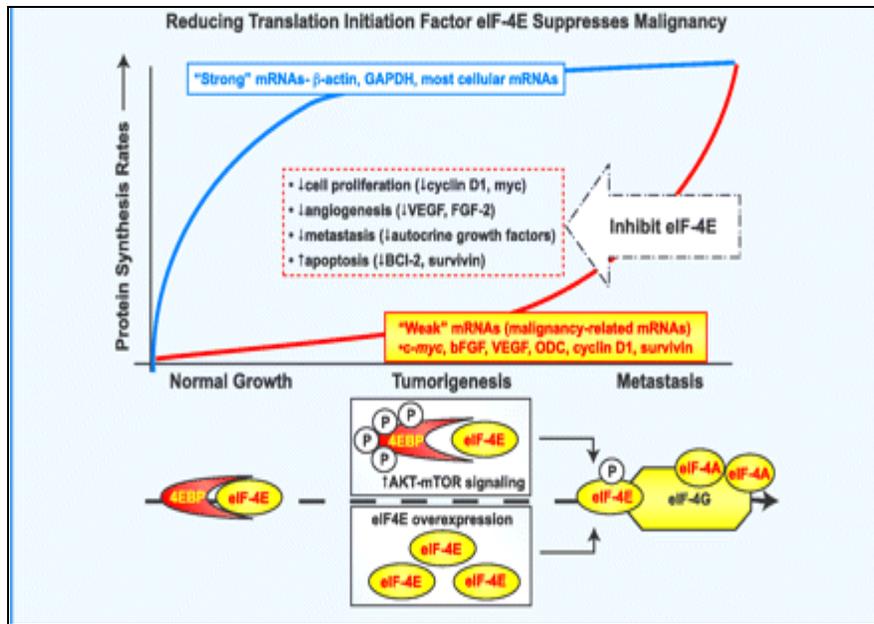


Figure 13. L'inhibition d'eIF4E altère le processus de cancérogénèse. En réduisant l'expression protéique d'eIF4E dans les tumeurs, il en résulterait une inhibition de la prolifération cellulaire, une suppression de l'angiogenèse liée au développement tumorale, une répression de l'activité métastatique, et une augmentation de l'apoptose par jeu sélectif sur l'expression de facteurs de croissance et de survie (par exemple : Survivin, ODC, c-myc, BCL-2, FGF-2 ou VEGF) (Graff et al, 2007). Ainsi, la diminution d'eIF4E aurait un effet minime sur la synthèse protéique totale car il cible de façon sélective des ARNm à traduire (tel que révisé dans la publication De Benedetti et Graff, 2004). Il faut noter que la Cyclin D1 a été montré par Rousseau et al, en 1996 comme n'étant finalement pas une cible traductionnelle d'eIF4E. (Adapté de Graff et al, 2008)

3.5.2. Le facteur 4E-BP1

Chez les mammifères, trois 4E-BPs ont été mises en évidence : 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 (Pause et al, 1994; Rousseau et al, 1996a; Poulin et al, 1998). Ces trois formes sont capables de fixer eIF4E et d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe. Les transcrits des trois 4E-BP sont localisés de façon ubiquitaire. Chez

les mammifères, le 4E-BP le plus étudié correspond au 4E-BP1. C'est d'ailleurs la protéine d'intérêt du projet principal de mon doctorat.

➤ Structure

4E-BP est une protéine complètement désordonnée (Fletcher et al, 1998); elle ne possède pas de structure secondaire. Il est admis que seule la région centrale de 4E-BP, qui contient le motif de liaison à eIF4E, se structure et s'associe avec eIF4E (Figure 14) (Fletcher et al, 1998; Marcotrigiano et al, 1999). En fait, la protéine 4E-BP1 lié à eIF4E mime de manière exacte la liaison avec eIF4G. 4E-BP1 se lie aussi sur la surface dorsale convexe d'eIF4E (Mader et al, 1995; Marcotrigiano et al, 1999). Néanmoins, il existe d'autres types de liaisons entre eIF4E et 4E-BP (Matsuo et al, 1997). Dernièrement, Paku et collaborateurs ont mis en évidence un motif en C-terminal de 4E-BP1, qui jouait un rôle majeur dans la liaison eIF4E/4E-BP en stabilisant cette interaction (Mizuno et al, 2008; Paku et al, 2012).

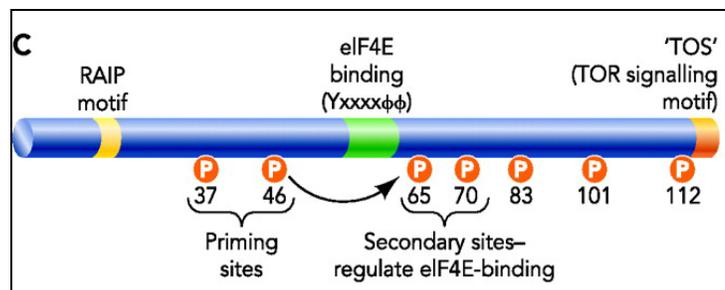


Figure 14. Schématisation de 4E-BP1. (Adapté de Wang et Proud 2006)

➤ **Fonction**

Les 4E-BPs sont impliqués dans de nombreux processus, tels que la progression du cycle cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire, la plasticité synaptique, la résistance aux infections virales, le métabolisme des graisses ou encore la réponse au manque de nourriture (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Richter and Sonenberg, 2005 ; Raught B., 2007; Sonenberg and Hinnebusch, 2007). En conditions de croissance cellulaire normales, le facteur eIF4E est lié aux eIF4E-binding proteins (ou 4E-BP) à l'intérieur du noyau (Rong et al, 2008). Cette séquestration nucléaire limite la traduction en inhibant l'association entre les facteurs eIF4E et eIF4G au niveau du cytoplasme, prévenant ainsi la formation de complexes eIF4F (Richter et Sonenberg, 2005). Ainsi, les 4E-BP sont des inhibiteurs compétitifs de la liaison eIF4E-eIF4G (De Benedetti et Graff, 2004; Goodfellow et Roberts, 2007).

Nota bene : un composant nommé « 4EGI-1 » (pour eIF4E/eIF4G inhibitor-1) est capable d'inhiber la liaison entre eIF4G et eIF4E sans pour autant perturber l'association de 4E-BP à eIF4E (Moerke et al, 2007). Cette molécule sera utilisée dans le cadre expérimental de mon projet de recherche principal (Chapitre 1 de la section Résultats).

➤ **Régulation**

L'état de phosphorylation de 4E-BP est classiquement associé à sa capacité de séquestrer eIF4E (Mader et al, 1995). Lorsque 4E-BP est hypophosphorylé, il s'associe à eIF4E et empêche la formation du complexe eIF4F. Par contre, l'hyperphosphorylation de 4E-BP1 empêche son association avec eIF4E qui est ainsi libre pour interagir avec eIF4G et d'initier la traduction (Gingras AC, 1998). Les 4E-BPs sont directement phosphorylés par la voie FRAP/mTOR, en aval de l'activation de la voie de signalisation PI3Kinase-Akt et ce, en réponse à la disponibilité des acides aminés, du statut de l'énergie cellulaire, de nombreuses situations de stress, etc...(Richter and Sonenberg, 2005; Raught B, 2007; Ma

and Blenis, 2009). 4E-BP est phosphorylé en plusieurs étapes (Gingras, 1999). Les sites Thr 37 et Thr 46 sont phosphorylés en premier. Il faut noter que ces phosphorylations sont insuffisantes pour dissocier le complexe eIF4E/4E-BP. Néanmoins, ces phosphorylations ne sont pas le seul mode de régulation de 4E-BP. 4E-BP peut aussi être régulé au niveau transcriptionnel (Rolli-Derkinderen et al, 2003; Yamaguchi et al, 2008; Azar et al, 2009).

➤ **Un rôle pour 4E-BP dans le processus de transformation maligne**

En parallèle, les facteurs 4E-BP sont capables de contrôler la transformation maligne en inhibant la croissance des cellules surexprimant eIF4E ou des cellules transformées par les gènes RAS ou src (Rousseau et al, 1996). En effet, quand on vient à améliorer l'interaction eIF4E-4E-BP, en surexprimant un mutant 4E-BP constitutivement actif, ceci conduit à une diminution de la taille des cellules et à une inhibition du cycle cellulaire (Fingar et al. 2002). De manière intéressante, la transfection dans les cellules de cancer du sein d'une construction codant pour 4E-BP1 muté sur ses sites de phosphorylation montre un effet anti-tumoral (Avdulov et al, 2004; Lynch et al 2004). De par son rôle inhibiteur sur l'initiation de la traduction, 4E-BP peut être considéré comme un suppresseur de tumeur (Martineau et al, 2012). Certains travaux ont même montré que la surexpression de 4E-BP1 ou 4E-BP2 inversait le phénotype tumoral associé à la surexpression d'eIF4E (Rousseau et al, 1996b). C'est l'état de phosphorylation de 4E-BP qui jouerait un rôle important dans les processus de transformation cellulaire et le développement des cancers. Dans la plupart des études, la phosphorylation tout comme le niveau d'expression de 4E-BP1 est un indicateur de la progression de la maladie dans les cancers du sein, des ovaires ou de la prostate par exemple,

et l'analyse de cette protéine permet d'identifier des patients à haut risque (Zhou et al, 2004; Castellvi et al, 2006; Armengol et al, 2007; Rojo et al, 2007).

En résumé, 4E-BP1, de concert avec eIF4E, peut représenter une cible intéressante pour réguler la prolifération et la survie cellulaire. Dans le cytoplasme, il joue un rôle important dans l'étape d'initiation de la traduction et il est également impliqué dans la formation granules de stress (Ainsi que vu dans le chapitre Résultats) tout comme eIF4E. Cependant 4E-BP1, n'est pas le seul partenaire d'eIF4E à jouer un rôle pivot dans l'initiation de la traduction et l'assemblage des GS. Il est donc crucial d'introduire cet autre partenaire d'eIF4E : à savoir eIF4GI.

3.5.3. Le facteur eIF4GI

Les eIF4G sont aussi des phosphoprotéines. Chez les vertébrés, eIF4G existe sous deux formes : eIF4GI et eIF4GII (Gradi et al, 1998; Imataka et al, 1998). eIF4GI est le plus étudié et est principalement responsable du recrutement du ribosome par le complexe eIF4F (Coldwell and Morley, 2006).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous n'évoquerons que l'isoforme eIF4GI.

➤ Structure

eIF4G est une protéine assez volumineuse (plus de 900 résidus) composée de multiples domaines. eIF4GI possède trois domaines: la partie N-terminale, le domaine central qui est essentiel pour l'assemblage de la machinerie de traduction et l'extrémité C-terminal qui semble jouer un rôle de modulation de la traduction (Raught et al, 2000). La figure ci-dessous résume la cartographie des interactions réalisées sur le facteur.

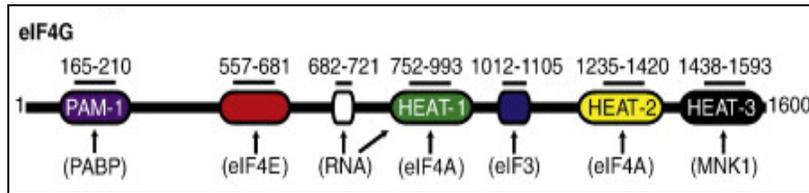


Figure 15. Schématisation de la protéine eIF4GI et ses domaines. En plus des domaines cités dans le corps du texte; on remarque aussi la présence de domaines HEAT (du nom de **H**untingtine, **E**longation 3, **A** sous-unité de la protéine phosphatase 2A, **T**arget of rapamycine) (Marcotrigiano et al, 2001). Enfin, la présence de trois sites de phosphorylation stimulé par le sérum et situés dans le domaine du milieu de la protéine suggère que l'activité peut être eIF4GI réglementé par des événements de phosphorylation (Adapté de Özès et al, 2011)

➤ **Fonction**

Au sein du complexe eIF4F, la sous-unité eIF4G joue le rôle d'un adaptateur qui relie les différents partenaires. eIF4G est ainsi capable de lier eIF4A et eIF4E, ses 2 partenaires du complexe eIF4F, mais également l'ARNm et la protéine liant la queue poly-(A) (PABP pour Poly(A) Binding Protein) (Prevot et al, 2003). Chez les mammifères, une interaction supplémentaire entre eIF4G et eIF3 est observée (Lamphear et al, 1995 ; Korneeva et al, 2000). De plus, elle renforce l'arrimage de l'ARNm sur la 40S (pour revues voir Hentze MW, 1997; Morley et al, 1997). Le facteur eIF4G interagit aussi avec les facteurs eIF5 et eIF1 afin de maintenir l'intégrité du complexe de pré-initiation (He et al, 2003). eIF4G joue donc un rôle de coordinateur dans le démarrage de la traduction (Morley et al, 1997).

En résumé de cette grande section introductive : eIF4E tout comme eIF4GI ou 4E-BP sont des cibles majeures dans la régulation de la prolifération et la survie

cellulaire. Dans le cytoplasme, ces facteurs jouent un rôle central dans l'étape d'initiation de la traduction mais sont aussi impliqués au niveau des granules de stress. Ils ont, d'ailleurs, un rôle majeur à jouer dans le processus d'oncogenèse et dans la réponse cellulaire au stress.

En amont de ces facteurs, demeure la kinase mTOR : pivot central dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires et régulateur principal de l'activité de 4E-BP1, d'eIF4E et indirectement, de eIF4GI.

3.5.4. La kinase mTOR : les acteurs principaux, activation et régulation

➤ Généralités

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une sérine-thréonine kinase intracellulaire ubiquitaire conservée de haut poids moléculaire (280 kDa) (pour revue : Hay et Sonenberg, 2004; Laplante et Sabatini, 2012). Elle est impliquée dans de multiples voies de signalisation interagissant avec de multiples facteurs de croissance et jouant un rôle crucial d'intégrateur métabolique dans la croissance et la survie cellulaire. Elle contrôle les réponses à la stimulation par facteur de croissance et la réponse cellulaire aux apports d'oxygène, d'énergie et de nutriments du micro-environnement (glucose, acides aminés). mTOR se situe au niveau de la voie de phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protéine kinase B (Akt).

➤ Caractéristiques moléculaires des protéines mTOR

Structure

mTOR possède six domaines principaux. Parmi eux, on identifie le domaine Kinase (KIN) qui confère son rôle principal et bien connu à mTOR. Ensuite, on

peut évoquer le domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding). Ce domaine est situé en amont du domaine kinase et il est spécifique des protéines TOR. C'est 'la' région à laquelle se fixe le module FKBP12-rapamycine (inhibiteur de mTOR) lors de la formation du complexe inhibiteur TOR-rapamycine-FKBP12 (Vilella-Bach et al, 1999) (Figure 16). Dans leur partie N-terminale, on retrouve les répétitions HEAT. Elles sont impliquées dans des interactions protéine-protéine. Ceci suggère que TOR pourrait faire partie d'un complexe multi-protéique (Groves et al, 1999 ; Andrade et Bork, 1995) (Figure 16).

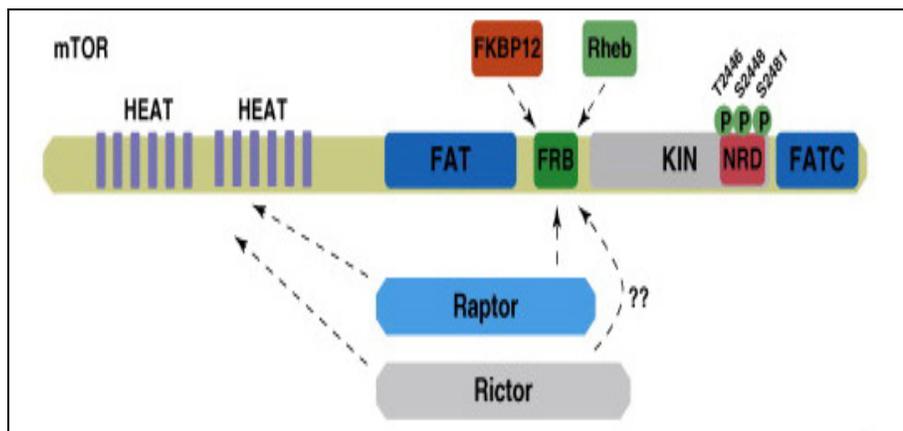


Figure 16. Structure représentative des protéines TOR. Ce schéma montre la position des différents domaines de mTOR. Répétition HEAT : répétition présente dans les protéines Huntingtin, facteur d'élongation 3, sous-unité A de la protéine phosphatase PP2A et TOR1 ; FAT : domaine conservé chez les protéines FRAP, ATM et TRRAP ; FRB : domaine de fixation à FKBP12-Rapamycine ; FATC : domaine C-terminal conservé chez les protéines FRAP, ATM et TRRAP. KIN : domaine Kinase. NRD : Négative regulatory domain. (Adapté de Hoeffr et Klann, 2010)

Un mode de contrôle de mTOR

L'activité de mTOR requiert une concentration particulièrement élevée en ATP. Cela pourrait s'expliquer par une structure particulière de la poche de fixation de l'ATP située au niveau du domaine kinase de mTOR. Ainsi, Dennis et collaborateurs ont proposé l'hypothèse que mTOR serait un senseur de la concentration d'ATP intracellulaire. Dès lors, de nouvelles molécules inhibitrices de mTOR ont été mises évidence. A la différence de la rapamycine, ces inhibiteurs de mTOR sont de deuxième génération et ils ciblent directement le domaine kinase de mTOR en mimant l'action de l'ATP, inhibant ainsi mTORC1 et mTORC2. Il s'agit, entre autre, du PP242 et de Torin-1 (Apsel et al, 2008 ; Feldman et al, 2009 ; Thoreen et al, 2009). Ces deux inhibiteurs sont d'un intérêt particulier, ici, car ils furent utilisés dans le cadre expérimental de mon projet principal de doctorat. Par ailleurs, il faut noter que mTOR est aussi régulé à d'autres niveaux, tous dépendant d'Akt.

➤ **Le complexes mTORC1 et mTORC2**

mTOR est au cœur de deux complexes catalytiques : mTOR complex 1 et 2 (mTORC1 et mTORC2)

Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est le plus connu et le mieux caractérisé (pour revue : Laplante et Sabatini, 2012). Il intervient dans la synthèse protéique et lipidique et régule aussi l'autophagie. Il est composé de mTOR, de mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8), et de **RAPTOR** (regulatory-associated protein to mTOR). Raptor, lui, fonctionne comme une protéine d'échafaudage qui lie le domaine kinase de mTOR aux substrats de mTORC1, afin d'assurer sa

signalisation (Dunlop and Tee 2009). mTOR s'associe aussi à PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40kDa), DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) et FKBP38 qui sont connus comme étant des régulateurs négatifs (Figure 17). Le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine. Son activité est liée à la présence de facteurs de croissance et à la disponibilité en nutriments (Ma et al, 2009).

Processus cellulaires induit par mTORC1

mTORC1 intègre diverses signalisations extra- et intracellulaire impliquées dans les processus cellulaires. Les facteurs de croissance et les nutriments stimulent la synthèse protéique dépendante de mTORC1, la croissance, la prolifération et le métabolisme cellulaire (Dunlop and Tee 2009). En cas d'insuffisance de ces facteurs ou de stress métabolique, l'action de mTORC1 est bloquée pour maintenir un taux de synthèse approprié pour des conditions cellulaires suboptimales. Une diminution de l'activité mTORC1 induit également l'autophagie, afin d'améliorer la survie cellulaire en cas de diminution de la disponibilité en nutriments (Neufeld TP, 2010). mTORC1 induit également la transcription des ARN ribosomiaux et la synthèse des protéines (Inoki et al, 2005). mTORC1 est un régulateur important de la synthèse protéique. Il est responsable de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6K (p70 ribosomal S6 kinase), une kinase de la famille AGC (protéine kinase A, G et C). L'activation de la S6K permet la phosphorylation d'eIF4B, favorisant son association au complexe de pré-initiation de la traduction. La S6K phosphoryle d'autres substrats impliqués dans la synthèse protéique, dont la protéine ribosomale S6 de la sous-unité 40S du ribosome, eEF2K (eukaryotic translation Elongation Factor 2 Kinase) et PDCD4 (Programmed Cell Death Protein 4) (Ma et al, 2009). mTORC1 favorise aussi la formation du complexe d'initiation de la traduction

eIF4F. Les protéines 4E-BP (4E-Binding Proteins) déplacent eIF4G pour se lier à eIF4E. En phosphorylant les 4E-BP, mTORC1 inhibe la liaison d'eIF4G à eIF4E et favorise la formation du complexe eIF4F.

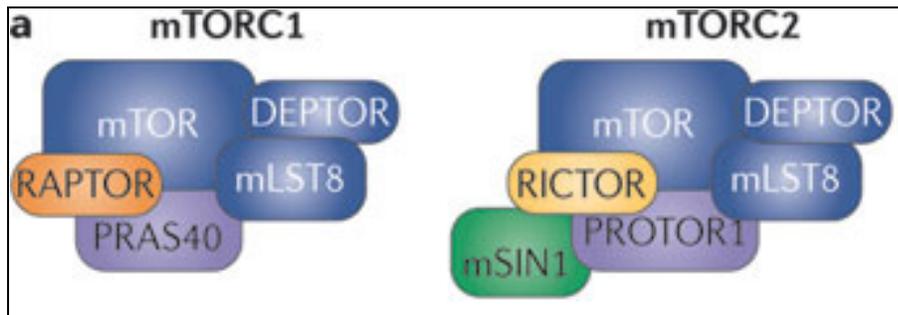


Figure 17. mTOR et ses complexes. (Adapté de Bové et al, 2011)

Le complexe mTORC2

Le complexe mTORC2 est composé de mTOR, **RICTOR** (rapamycin- insensitive companion of TOR), SIN1 (stress-activated map kinase-interacting protein 1) et mLST8/GβL. Il s'associe aussi avec le régulateur négatif DEPTOR, et avec PPR5/PROTOR, dont la fonction est inconnue. Il n'est pas sensible à la rapamycine (pour revue : Laplante et Sabatini, 2012) (Figure 28).

Processus cellulaires induit par mTORC2

La sérine/thréonine kinase Akt est le premier substrat identifié de ce complexe. mTORC2 phosphoryle également les motifs hydrophobes de SGK1 (ser422) et de PKCa (ser657) (Alessi et al, 2009).

Ce complexe est impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Sarbassov et al, 2004) mais aussi dans la croissance et le cycle cellulaire

(Rosner et al. 2009). Il permet également de diminuer la consommation d'oxygène de la mitochondrie (Schieke et al, 2006).

Pour résumer, mTOR est responsable de la phosphorylation de plusieurs protéines dont 4E-BP; rendant ainsi disponible le facteur eIF4E pour la traduction. Des conditions de stress environnemental, telles que la déplétion de nutriment, l'hypoxie, le stress métabolique, le stress osmotique, des dommages à l'ADN, et le choc thermique peuvent moduler l'activité de mTORC1 (Wullschleger et al, 2006; Hay et Sonenberg, 2004; Reiling et Sabatini, 2006). On retrouve généralement mTOR dans le cytoplasme. Néanmoins et dépendamment de la nature du stress subi par la cellule, mTOR ou certains de ses composants se relocalisent dans les granules de stress (Wippich et al, 2013; Thedieck et al, 2013.)

4. LES GRANULES DE STRESS

4.1. Un phénomène inter-espèces évolutif

L'exposition des cellules au stress peut perturber le déroulement de processus intracellulaires essentiels. Pour survivre à un stress qui leur est imposé par leur environnement, elles doivent donc mettre en place différents mécanismes de défenses afin de s'adapter à la situation. Un des mécanismes de défense déployé est la formation intracellulaire des granules de stress (GS).

Découvertes au début des années 1980 (Nover et al, 1983), les GS sont, en fait, des entités cytoplasmiques non membranaires dont la constitution varie en fonction du stress appliqué à la cellule et du type cellulaire (Kedersha et al, 1999; Anderson et Kedersha, 2002a). Ils apparaissent seulement lors d'un stress cellulaire. Appartenant à la famille des granules à ARN (Buchan et Parker, 2009), les GS sont communément associés au réseau des microtubules. En effet, l'utilisation du nocodazole, agent capable de dépolariser les microtubules, empêchent la formation de GS (Ivanov et al, 2003; Kwon et al, 2007; Kolobova et al, 2009; Fujimura et al, 2009; Loschi et al, 2009). La forme des GS est variable. Leur taille évolue généralement entre 1 et 3 μm . Généralement, les GS sont plutôt glogulaire (Collier et al, 1988). Néanmoins, si la cellule subit un stress prolongé, les granules de stress peuvent s'agglutiner et former des structures plus denses et tortueuses (Collier et al, 1988 ; Kedersha et al, 2000 ; Ivanov et al, 2003).

De nombreux travaux démontrent une conservation inter-espèces des GS. La drosophile est capable de former des GS, ainsi que le démontra notre laboratoire, réitérant les données de l'équipe de Silver (Farny et al, 2009). Il est ainsi facile d'observer des GS au sein des chloroplastes de plantes (Uniacke et Zerges, 2009), des levures (Buchan et al, 2009 ; Nilsson et al, 2011), du trypanosoma brucei (Kramer et al, 2008) mais aussi chez C.elegans (Jud et al, 2008). De même qu'en condition de stress, seulement, il est à noter que certains types cellulaires du corps humain sont capables de former des GS. Autant les cellules

saines que les cellules cancéreuses. Néanmoins ce ne sont pas tous les types cellulaires humains qui sont doués d'assemblage des GS comme le démontre certains travaux de notre laboratoire (Fournier et Gareau, 2010) mais aussi comme il le fut révisé dans les publications des équipes d'Anderson et de Parker. Cette conservation évolutive inter-espèces de l'assemblage des GS manifeste d'un rôle majeur de leur formation dans la réponse cellulaire au stress.

4.2. Quelques inducteurs de granules de stress

Les travaux de recherche décrit au travers de cette thèse portent essentiellement sur les cellules cancéreuses. Dans le présent paragraphe, nous nous attarderons donc aux inducteurs des GS spécifiques aux cellules des mammifères. Dès lors, plusieurs types de stress peuvent déclencher, l'assemblage des GS. De façon non exhaustive, on retrouve les radiations ionisantes (Moeller et al, 2004), l'infection virale (McInerney et al, 2005), le choc thermique (Kedersha et al, 1999) ou encore le stress oxydatif (Kedersha et al, 1999) mais aussi les traitements thérapeutiques anti-cancer de type chimiothérapie (Fournier et al, 2010). « De plus, la surexpression de différentes protéines de liaison à l'ARN, telles que TIA, FMRP, CPEB1, TTP, G3BP et SMN, induit la formation de GS, et ce en absence de stress (Mazroui et al. 2002, Gilks et al. 2004 Wilczinska et al. 2005; Tourrière et al, 2003; Hua et Zhou, 2004). (Adapté de Mokas, 2012) ». Face à ces types de stress, les cellules formeraient les GS afin d'assurer leur survie. De plus, l'application de traitements chimiothérapeutiques sur les cellules cancéreuses génèrent des GS dont l'assemblage engendre, in fine, la résistance cellulaire à la mort normalement induite par les drogues anti-cancers. Dès lors, il est communément admis, dans les travaux de recherche, que les GS puissent

constituer un événement de résistance thérapeutique (Fournier, Gareau et al, 2010 ; Gareau et al, 2011 ; Coudert, Fournier et al, 2013).

4.3. Caractéristiques principales des GS

Il faut se rappeler que la plupart des stress menant à la formation des GS inhibent aussi l'initiation de la traduction des ARNm. Il est ainsi suggéré que ce type de granules puisse constituer un lieu de stockage des ARNms, sous leur forme non-traduite. Enfin, quand le stress cellulaire n'agit plus sur les cellules, les GS initient leur désassemblage. (Pour revue : Anderson et Kedersha, 2008).

Dès lors, la caractéristique essentielle des GS est la réversibilité de ces entités intracellulaires. Ce n'est seulement qu'en période de stress que les GS se forment. Une fois ce stress éliminé, les granules se désassemblent pour laisser la cellule recouvrir du stress imposé ultérieurement. Les GS sont dites transitoires.

De plus, les GS sont des éléments extrêmement dynamiques. « On remarque, par exemple, que certains constituants des GS passent d'une localisation à une autre. En effet, des expériences de FLIP (Fluorescence loss after photobleaching) démontrent que la protéine de liaison à l'ARN CUGBP1 est constamment exportée du noyau vers les GS en présence de stress et ensuite des GS vers le noyau (Fujimura et al, 2008). (Adapté de Mokas, 2012) ». Ainsi que l'ont montré des études de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), les constituants des GS vont et viennent dans ces entités (Kedersha et al, 2000, Gareau et al, 2013) (figure18). La logique de ce flux continu des composants entre le cytoplasme et les GS n'est pas encore totalement élucidée. De même que la caractérisation biochimique de ces granules est particulièrement laborieuse. C'est ainsi que la grande majorité des constituants des GS furent identifiés par des techniques de microscopie à fluorescence.

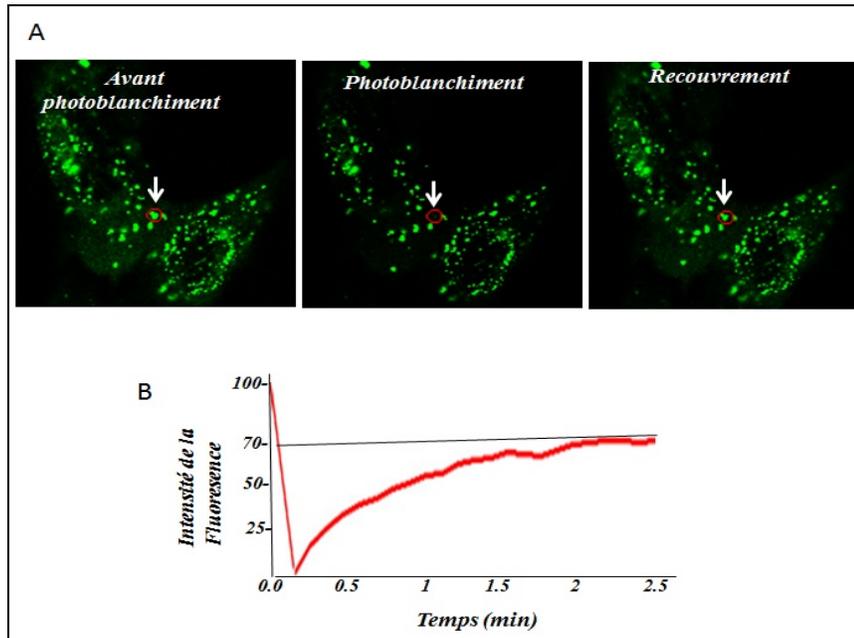


Figure 18. Les GS sont dynamiques. Les cellules HeLa exprimant le marqueur GFP-FMRP des GS ont été traitées avec l'arsenite pour induire la formation des GS. Les GS ont été « photoblanchi » à l'aide de lasers (A ; la zone photoblanchi est indiquée par une flèche). L'intensité de la fluorescence récupérée après le « photoblanchiment » est ensuite mesurée (B). Noter que le recouvrement de 50% de la fluorescence se fait en moins d'une minute, démontrant un va et viens rapide des composantes des GS. Analyse produite au sein de notre laboratoire. (Dixit Coudert et Mazroui, 2013)

4.4. Constituants principaux des GS

4.4.1. Généralités

Au sein des GS, différents type de constituants peuvent être recrutés. Il existe deux classes de composants des GS, à savoir les constituants dit « nucléateur » et les constituants recrutés par le biais des nucléateurs (Buchan et Parker, 2009; Anderson et Kedersha. 2008; Anderson et Kedersha, 2009). Les constituants de type nucléateur sont essentiellement des facteurs d'initiation de la traduction tels que eIF4E, eIF4G, eIF3, eIF2 α (Kedersha et al, 1999; Kimball et al, 2003; Kedersha et al, 2005; Mazroui et al, 2006; Mokas et al, 2009) et des protéines de liaison à l'ARNm (Kedersha et al 1999; Gallouzi et al, 2000; Mazroui et al, 2002; Gareau et al, 2011 et 2013). Ce sont aussi les petites sous-unités ribosomales (Mazroui et al, 2002; Kedersha et al, 2002). Les grandes sous-unités ribosomales ainsi que certains facteurs d'élongation de la traduction ne sont pas recrutés au sein des GS. Dès lors, les GS sont considérés comme des sites où la traduction des ARNm est inactive. Cependant, ce sont 70% des ARNm totaux sont relocalisés dans ces granules formées en condition de stress, au sein des cellules de mammifères. Pourtant, les études d'hybridation in situ ont réussi à identifier de façon spécifique qu'une dizaine d'ARNm allant dans les GS.

4.4.2. ARNm

Les GS sont aussi le site de relocalisation, en condition de stress variés (hypoxie, radiations ionisantes, inhibiteur du protéasome, ...) de certaines molécules de signalisation de mort cellulaire. On retrouve notamment des ARNm dont la régulation est régie par l'hypoxie (Moeller et al, 2004) mais aussi des ARNm codant pour des protéines du cycle cellulaire comme p21 (Gareau et al, 2011).

De façon non exhaustive, on peut retrouver des ARNm TOP codant pour les protéines ribosomales (Damgaard et al, 2011) ainsi que les ARNm régulés par HIF-1 tels que VEGF (Moeller et al, 2004). Mais aussi des ARNm de GAPDH (Stohr et al, 2006, Gareau et al, 2011), de beta-actine (Stohr et al, 2006) ou de c-Myc (Stohr et al, 2006). Et en 2011, notre laboratoire a démontré l'accumulation massive (80%) et stabilisation de l'ARNm de p21 dans ces mêmes GS (Gareau et al, 2011) (figure 19). En effet, la relocalisation des ARNm au sein des GS corrèle avec leur stabilisation dans ces sites de stockage temporaires. Dans ce contexte de stress, les ARNm possèdent donc une solution échappatoire à leur devenir funeste lorsqu'ils se relocalisent dans les GS. Dès lors, le désassemblage naturel ou forcée des GS empêche la stabilisation des ARNm comme celui de p21, et déclenche sa destruction par la machinerie de dégradation des ARNm. En effet, des travaux ont démontré que la majorité des enzymes de dégradation des ARNm étaient absentes des GS (Kedersha et Anderson, 2007; Mokas et al, 2009). Les GS représentent donc des sites de protection pour certains ARNm trop labiles. C'est ainsi que des analyses d'expression génomique de tous types cellulaires ne pouvant pas former les GS permettrait d'identifier les ARNm dont la stabilisation dépend des GS.

Si on admet ce rôle des GS comme étant une barrière physique contre les enzymes de dégradation des ARNm, il est légitime de s'interroger sur les protéines qui assurent le recrutement/redirection de ces ARNm au sein de ces mêmes granules.

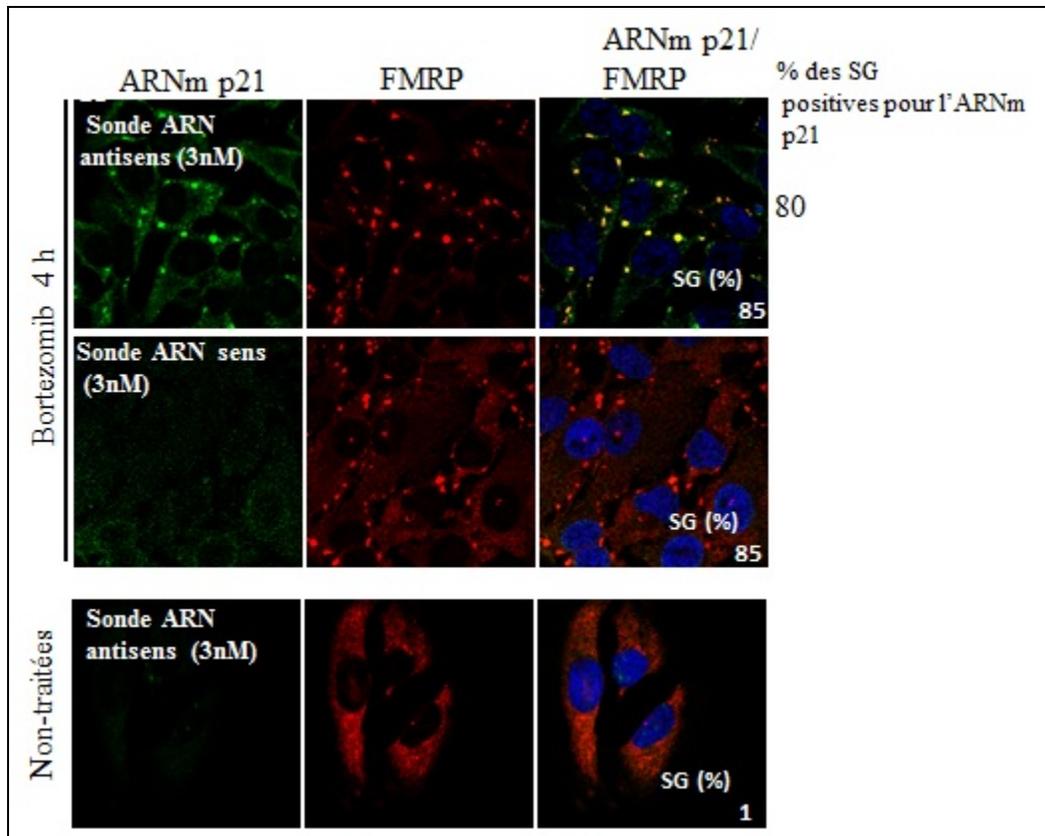


Figure 19. Bortezomib induit l'accumulation de l'ARNm p21 dans les GS comme démontré par la fluorescence locale (FISH). Les cellules HeLa ont été traitées avec le Bortezomib (2 μ M) pour induire la formation des GS. Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été incubées avec une sonde ARN anti-sens marquée au Alexa fluor 488 pour détecter l'ARNm p21, ou avec une sonde contrôle sens marquée avec de l'Alexa fluor 488. Les GS ont été détectées en utilisant des anticorps spécifiques de la protéine du retard mental fragile X (Fragile X Mental Retardation Protein; FMRP), l'un des marqueurs des GS. Le pourcentage des GS contenant l'ARNm p21 est indiqué. (Dixit Coudert et Mazroui, 2013)

4.4.3. Protéines de liaison à l'ARN

De nombreuses études sont parvenues à identifier certaines protéines de liaison à l'ARN comme étant des constituants principaux des GS. Parmi elles, nous retrouvons par exemple la protéine G3BP (Tourrière et al, 2003), TIA (Kedersha et al, 2008), Hur (Gallouzi et al, 2000), FMRP (Mazroui et al, 2002), TDRD3 (Goulet et al, 2008) ou encore CUGBP1 qui est responsable, entre autre de la relocalisation de p21 dans les GS (Gareau et al, 2011). La relocalisation, en période de stress, des protéines liant l'ARN dans les GS, joue donc un rôle majeur dans l'accumulation et la stabilisation de leurs ARNm cible.

4.4.4. Molécules de signalisation associées à la mort cellulaire

La protéine TRAF2, impliquée dans la réaction pro-inflammatoire de mort cellulaire NF- κ B, peut aussi être recruté au sein des GS induite par choc thermique (Kim et al, 2005). De la même façon, la protéine d'échafaudage et d'activation de kinases RACK1, aussi impliquée dans la voie apoptotique p38 et JNK-MAPK, peut se relocaliser dans les GS (Arimoto et al, 2008). Un dernier exemple avec RSK2, facteur régulateur de la croissance et prolifération cellulaire, qui est redirigé dans les GS lorsque la cellule subit un stress oxydatif (Eisinger-Mathason et al, 2008).

4.4.5. Protéines associées à la neurodégénération cellulaire

En effet, les GS peuvent aussi être le lieu physique de recrutement de certaines protéines de signalisation impliquées dans les maladies neurodégénératives (pour revue Anderson et Kedersha, 2008; Vanderweyde et al, 2013). Par exemple, FMRP (Fragile Mental Retardation Protein), dont la mutation génique cause le syndrome de Fragile X, est connu pour être un marqueur caractéristique des GS. De même que SMN1, protéine jouant un rôle majeur dans la sclérose latérale amyotrophique (ALS), est aussi retrouvé dans les GS. Sans oublier, comme autres exemples, les protéines TDP-43, FUS, ataxin-2, OPT ou encore ANG qui sont toutes reliées au processus pathologique de neurodégénérescence (Pour revue : Vanderweyde et al, 2013).

Ces paragraphes font une liste, bien sûr, non exhaustive des constituants jusqu'à présent connus comme pouvant se relocaliser au sein des GS (pour revue : Anderson et Kedersha, 2008; Buchan et Parker, 2009). Le domaine de recherche associé aux granules de stress est encore récent. Un certain nombre de ses constituants sont identifiées néanmoins les travaux de recherche actuels démontrent qu'ils ne sont pas encore tous connus. Il en est de même pour les mécanismes de formation de ces granules.

4.5. Les mécanismes de formation des GS connus à ce jour

Lors de la réponse au stress, l'étape d'initiation de la traduction est un processus hautement régulé (Holcik et Sonenberg, 2005). Elle est notamment régie par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Cet état phosphorylé d'eIF2 α est un événement majeur dans le processus d'initiation de la formation des GS (Kedersha et al, 1999; McEwen et al, 2005).

4.5.1. Assemblage des GS dépendant de la phosphorylation du facteur eIF2 α

Première voie de signalisation démontrée comme étant impliquée dans la formation des GS (Kedersha et al, 1999), la phosphorylation d'eIF2 α est induite par différents stress tel que le choc thermique, le stress oxydatif, l'inhibition du protéasome, etc. Généralement, il est démontré que les stress qui induisent la phosphorylation du facteur eIF2 α le font au niveau de la serine 51 (Anderson et Kedersha, 2009 ; Fournier et al, 2010). Ce nouvel état d'eIF2 α entrave l'association du facteur eIF2 avec le GTP. Et de fait, il y a inhibition de la formation des complexes tertiaires eIF2.GTP.Met-tRNA^{iMet} (Holcik et Sonenberg, 2005). Par la suite, ces complexes d'initiation de la traduction incompetents pour la traduction s'accumulent au sein de la cellule stressée. C'est cette accumulation des complexes tertiaires déficients qui déclenche l'assemblage des GS (Kedersha et al, 2002 ; Kedersha et Anderson, 2002). En condition de stress, il apparaît que la phosphorylation d'eIF2 α soit un phénomène clé dans l'induction de l'assemblage des GS.

Il faut noter que l'état de phosphorylation d'eIF2 α est régi par quatre kinases de stress : **HRI**, **PERK**, **PKR** et **GCN2**. Le rôle de ces kinases dans la formation des GS est bien établi ; néanmoins il n'est pas encore totalement connu. Ainsi, GCN2 (protéine general control non-derepressible-2) est impliquée dans la formation des GS induites par l'inhibition du protéasome au sein des cellules embryonnaires fibroblastiques de souris (Mazroui et al, 2007). Dans le contexte de l'infection virale, PKR (protéine kinase R) intervient de façon prépondérante dans la formation des GS (McInerney et al, 2005, Mazroui et al, 2006). Quant à PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), cette kinase est impliquée dans la

formation des GS dans le cadre du stress du réticulum endoplasmique (Kimball et al, 2003). Sans oublier la protéine heme-regulated Inhibitor HRI qui, lors d'un stress oxydatif de type Arsenite ou de type inhibiteur du protéasome, régule l'assemblage des GS (McEwen et al, 2005 ; Fournier et al, 2010).

Concernant HRI, notre laboratoire a mis en évidence le rôle majeur de cette kinase dans la formation des GS. En effet, il fut montré en condition de traitement chimiothérapeutique des cellules cancéreuses, via la phosphorylation d'eIF2 α (Fournier et al, 2010). Dès lors, il semblerait que les kinases de stress, en induisant l'assemblage des GS, puissent jouer un rôle inattendu dans le processus de chimiorésistance des cellules cancéreuses. Nos présents travaux de recherche vont dans cette direction. Ils essaient de déterminer si HRI pourrait être une cible thérapeutique dans le cadre de traitement des cancers chimio-résistants.

4.5.2. Assemblage des GS dépendant des autres facteurs d'initiation de la traduction

Nos précédents travaux de recherche (Mazroui et al, 2006), corrélé aux études de différents laboratoires, ont mis en évidence que l'inactivation du facteur eIF4A (soit par la Pateamine A ou par l'Hippuristanol (Low et al, 2005 ; Bordeleau et al, 2006)) est suffisante pour induire la formation des GS, dans les cellules dépourvues de stress, sans pour autant induire la phosphorylation du facteur eIF2 α . Pateamine A et Hippuristanol sont des inhibiteurs de l'initiation de la traduction. Ils ciblent le facteur d'initiation de la traduction eIF4A (Low et al, 2005 ; Bordeleau et al, 2006) et de ce fait, ils inhibent l'interaction entre le 40S et l'ARNm. Dès lors, ces études bouleversent le concept selon lequel la formation des GS nécessiterait l'interaction entre 40S et l'ARNm. Considérant l'ensemble de ces études, on peut déduire l'existence certaine de voies de formation alternatives des GS. Celles-ci sont toutes reliées au processus d'inhibition de l'initiation de la traduction. Néanmoins, nous retenons le fait que les étapes et

l'ordre chronologique d'assemblage de ces granules ne soit pas totalement élucidé. L'ensemble de ces données viennent donc appuyer le modèle selon lequel, au cours d'un stress de la cellule, le phénomène d'inhibition de l'initiation de la traduction serait intimement lié à la formation des GS. Ainsi, la formation des GS ne serait pas seulement due à l'apport de stress à la cellule.

D'un autre côté, notre laboratoire a mené un criblage des facteurs d'initiation de la traduction afin de mettre en évidence ceux dont l'inactivation induisait la formation des GS, au sein de cellules dépourvues de stress (Mokas et al, 2009). Ainsi, l'inactivation d'eIF2, eIF4B, eIF4H ou PABP suffit pour induire l'assemblage des GS. En parallèle, cette étude a mis en évidence deux étapes de l'initiation de la traduction (formation du facteur eIF4F et recrutement de la sous-unité ribosomale 60S) dont la répression n'induisait pas la formation des GS. De même que la déplétion de certaines sous-unités du facteur eIF3 (Ohn et al, 2008) n'induit pas de GS. A la lumière de ces nouvelles données, on peut conclure que dans certains cas de figure, un découplage existe entre la formation des GS et les processus régulant la répression de la traduction. De plus, il semblerait que l'assemblage de ces granules ne soit possible qu'à un moment particulier de l'initiation de la traduction. Enfin, certains facteurs de l'initiation sont bien susceptibles d'être nécessaires à la formation des GS

Dès lors, l'initiation de la traduction étant une cible privilégiée dans le traitement du cancer (Averous et al, 2006 ; Huang et al, 2003 ; Mamane et al, 2006 ; Mamane et al, 2004 ; Nathan et al, 2004 ; Petroulakis et al, 2006), nos travaux ont donc mis en exergue deux étapes clés de l'initiation de la traduction qui peuvent être ciblées sans pour autant induire l'assemblage des GS et la résistance à la mort cellulaire qui lui est associée. Dans une optique similaire, l'inhibiteur de la traduction 4EGI-1 inactive le facteur eIF4E (Moerke et al, 2007). Néanmoins, cette inactivation du facteur de la traduction eIF4E, que l'on sait être impliqué dans le processus de tumorigenèse, n'entraîne pas l'apparition de GS à

contrario de son confrère inactif eIF4A. Ce résultat permet de présumer d'un rôle prépondérant d'eIF4E dans la formation des GS induites par un stress appliqué à la cellule. Les travaux présentés dans cette thèse ont d'ailleurs démontré que l'inactivation du facteur eIF4E ainsi que sa voie régulatrice associée à mTOR inhibe la formation des GS lors de traitements chimiothérapeutiques, sensibilisant ainsi les cellules cancéreuses résistantes à la mort cellulaire (Coudert et al, 2013). Dès lors, nous essayons, à présent d'en déduire quelles seraient les étapes et les autres acteurs impliqués dans l'assemblage de ces GS induites par le Bortezomib.

4.6. Désassemblage des GS

Le désassemblage des GS est un mécanisme très peu connu. La communauté scientifique s'entend pour explorer et identifier, en premier, les mécanismes précis d'assemblage des GS. Néanmoins, quelques informations relatives à la dépolymérisation des GS émergent à travers l'ensemble des travaux menés par les chercheurs du domaine. En effet, le désassemblage des GS corrèle, généralement, avec l'élimination du stress qu'on a appliqué à la cellule. De plus, on remarque une reprise de l'activité traductionnelle de la cellule quand les GS se dépolymérisent (Mazroui et al, 2007). Mais pas seulement ...

Il semble exister un équilibre entre la formation des GS et les polysomes. En effet, les inhibiteurs de la synthèse protéique qui stabilisent les polysomes, tels que l'émétine et la cycloheximide, semblent prévenir, voire supprimer la formation de GS. (Kedersha et al, 2000; Buchan et al, 2008). De plus, l'ajout d'émétine à des cellules déjà stressées provoque le désassemblage des GS préexistants et les inhibiteurs de la synthèse protéique qui déstabilisent les polysomes, tels que la puromycine, favorisent la formation des GS (Kedersha et al, 2000). (Dixit Mokal, 2012)

Par ailleurs, de nouveaux travaux (Buchan et al, 2013) ont mis en évidence, au sein des levures et des cellules de mammifères, l'existence d'un processus d'élimination des GS par la voie autophagique, nommée granulophagie. Et d'une pierre deux coups, ces résultats font aussi l'état d'une hypothèse que ce processus de granulophagie pourrait réduire le développement de certaines maladies neurodégénératives; ramenant les GS à leur rôle connu dans la pathogénèse de certaines maladies comme le Cancer ou la neurodégénérescence.

4.7. Les rôles connus des GS

De par leurs caractéristiques variées et la nature de leurs composants, les GS accomplissent plusieurs types de fonctions. Certaines sont bien établies même si non comprises dans leur ensemble et d'autres sont encore au stade hypothétique.

4.7.1. Au niveau de la traduction

Les GS ont longtemps eu une fonction hypothétique dans l'inhibition de la traduction générale des cellules. En effet, de nombreux composants des GS sont des répresseurs traductionnels, et la formation de ces granules coïncident avec une diminution de la traduction générale (Anderson et Kedersha, 2009). Cependant, la formation des GS est clairement non requise pour l'inhibition de la traduction générale (Kwon et al, 2007 ; Buchan et al, 2008 ; Ohn et al, 2008 ; Mokas et al, 2009 ; Fujimura et al, 2009 ; Loschi et al, 2009). En effet, l'étude de Buchan et al, en 2008, a quelque peu bouleversé l'hypothèse que les GS soient des lieux d'inhibition de la traduction. Dans leur travail, les chercheurs

démontrent qu'en condition de stress, certaines souches de levures mutantes sont incapables de former des GS. Néanmoins, celles-ci parviennent quand même à maintenir leur capacité à inhiber la traduction des ARNm. Ces données n'excluent cependant pas un rôle majeur des GS dans l'inhibition spécifique de certains ARNm recrutés par leur protéines de liaisons à l'ARN 'partenaire'. En effet, des ARNm spécifiques sont inefficacement réprimés quand les protéines de liaisons à l'ARN, qui contribuent à la formation des GS, sont altérées (Kedersha et al, 2000; Moeller et al, 2004; Mazroui et al, 2007 ; Tsai et al, 2008).

4.7.2. Au niveau de la stabilisation de certains ARNm

Dès lors, les GS sont aussi considérés comme un site de protection pour certains ARNm spécifiques et nécessaire au bon déroulement de la réponse au stress mis en place par la cellule. En effet, la formation des GS corrèle généralement avec une diminution globale de la traduction et la répression ciblée d'ARNm particuliers tels que ceux codant pour des fonctions du cycle cellulaire ou de la survie. C'est ainsi que les GS peuvent assurer une fonction dans le processus de stabilisation de certains ARNm. De nombreux travaux ont montré que dans le cadre d'une grande variété de réponses au stress, certains ARNm impliqués dans la survie ou la mort cellulaire pouvaient se relocaliser dans les GS (Moeller et al, 2004; Gareau et al, 2011). L'ARNm de p21 en fait parti.

La protéine p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor) inhibe le cycle cellulaire en phase G1. De ce fait, elle est impliquée dans la différenciation cellulaire et la sénescence et fut originellement décrite comme inhibitrice de la progression tumorale (Gartel et al, 1996 ; Adnane et al, 2000 ; Gartel et al, 2005). D'autres études ont cependant révélé un rôle anti-apoptotique de la protéine p21 (Asada et al, 1999 ; Baus et al, 2003 ; Charrier-Savournin, 2004). Il fut démontré que les conditions de stress, incluant le traitement thérapeutique anti-cancer, induisaient une surexpression de la protéine. La surproduction de protéine p21 inhibe ensuite l'activité de la machinerie apoptotique, permettant la résistance des cellules à la mort engendrée par le stress (Asada et al, 1999 ; Gartel et al, 2002). (Dixit Coudert et Mazroui, 2013)

A l'issue de la période de stress, ces ARNm sont massivement relâchés et traduits. En fonction de la nature de ces ARNm, la cellule pourra recouvrir du stress subit ou mourir. De par cette capacité, les GS peuvent participer aux décisions « de vie ou de mort » des cellules en détresse, en régulant de façon sélective l'activation des protéines de signalisation ainsi que l'expression des ARNm impliqués dans la survie cellulaire et l'apoptose.

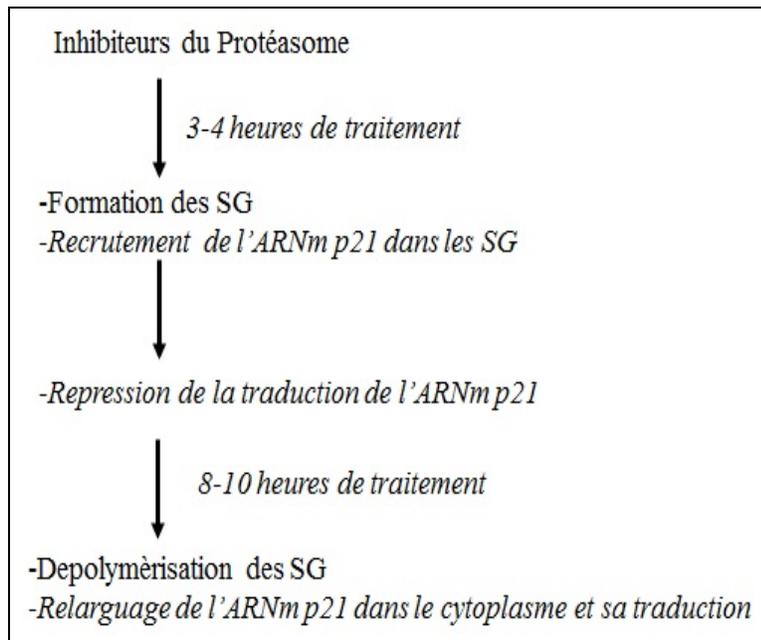


Figure 20. Rôle potentiel des GS dans la régulation de l'expression de l'ARNm p21. Le traitement des cellules HeLa avec les inhibiteurs de protéasome pendant 3-4 h induit la formation des GS, où l'ARNm p21 s'accumule. À cause de sa séquestration dans les GS, l'ARNm p21 n'est pas traduit. Le traitement prolongé (8-10 h) des cellules avec les inhibiteurs du protéasome induit une dépolymérisation des GS qui libèrent le pool accumulé de l'ARNm p21 qui sera massivement traduit en protéines. (Dixit Coudert et al, 2013)

D'une façon générale, les résultats de cette étude suggèrent donc que le recrutement et la stabilisation des ARNm au niveau des GS peuvent réprimer leur traduction. Dans un même état d'esprit, de nouveaux travaux ont permis la reconstitution in vitro de granules à ARN. Ce type de granules ayant des similarités fortes avec les GS de par leur composition (Han et al, 2012; Kato et al, 2012), elles sont, par définition, un modèle d'étude idéal pour mener une identification des ARNm constitutifs. Des études futures de séquençage à haut débit devraient confirmer la localisation de ces mêmes ARNm dans les GS. Dès lors, il deviendra aisé de confirmer le rôle majeur des GS dans l'inhibition de la traduction des ARNm.

4.7.3. GS et pathologies: quels liens?

Les GS peut participer aux décisions de vie ou de mort dans les cellules stressées en exerçant une réglementation sélective de l'expression d'ARNm et de protéines impliquées dans la survie des cellules. En effet, de nombreux virus régulent l'assemblage ou la dépolymérisation des GS (McInerney et al, 2005; Li et al, 2002; Esclatine et al, 2004; Emara et al, 2007; White et al, 2007), ce qui suggère leur importance dans l'équilibre traductionnel des ARNm de l'hôte et ceux codées par le virus. Les GS sont également impliqués dans la pathogenèse des maladies (Antar et al, 2005; Moeller et al, 2004; Garber et al, 2006; Khandjian et al, 2004; Monani et al, 2005; Rossol et al, 2003; Kayali et al, 2005; Montie et al, 2005; DeGracia et al, 2006; Murphy et al, 2006; Mangiardi et al, 2004; Scheu et al, 2006); une preuve supplémentaire pour un rôle dans l'intégration des décisions de vie et de mort de la cellule. Par exemple, les GS et leurs composants sont impliqués dans l'infection virale (Beckham et Parker, 2008) mais aussi dans le processus d'inflammation (Anderson, 2008 ; Scheu et al, 2006), le cancer (Arimoto et al, 2008; Moeller et al, 2004) et plusieurs

maladies neurologiques y compris le syndrome de l'X fragile (Vanderklish et Edlemann, 2005), l'amyotrophie spinale (McWhorter et al, 2003) , l'ataxie spinocérébelleuse 2 (Nonhoff et al, 2007) , et la dystrophie myotonique (Ranum et Cooper, 2006). Déterminer le rôle des GS dans ces pathologies devient primordiale pour permettre une meilleure compréhension des dites maladies et le développement de thérapies appropriées et efficaces.

➤ **GS, survie cellulaire et Cancer**

De nombreux travaux mettent en exergue le rôle des GS dans le processus de résistance développée par la cellule quand celle-ci subit un stress. Les GS agirait selon deux modes opératoires : surexpression de facteurs de survie et séquestration de protéines de signalisation associées à la mort cellulaire.

Via la surexpression de facteurs de survie

En fonction du type de stress, les GS permettraient la stabilisation puis la surexpression de facteurs impliqués dans la survie de la cellule. Parmi les exemples donnés par la littérature, nous retiendrons l'étude de Moeller et al, en 2004. Dans ce travail, l'équipe de recherche a mis en évidence l'effet stressant de la radiothérapie sur les cellules tumorales. La conséquence de ce stress réside dans l'induction de l'assemblage des GS au sein de la tumeur, suite aux conditions hypoxiques créés par les radiations. Au sein de ces granules seront recrutés des ARNm codant pour un certain nombre de cytokines impliquées dans la survie cellulaire (VEGF, bFGF...). Lorsque la zone de tumeur irradiée est réoxygénée, il s'ensuit une dépolymérisation des GS. Le pool accumulé d'ARNm est alors traduits en cytokines Ces dernières garantissent la survie des cellules endothéliales. Elles-mêmes sont responsables du processus de vascularisation de la tumeur. Dès lors, la tumeur résiste aux radiations et continue à évoluer. Cette étude met en exergue un lien entre la formation des GS et la radiorésistance des

tumeurs. Ainsi, ce « lien fonctionnel » peut-être utilisé comme une potentielle cible thérapeutique pour le traitement des cancers radio-résistants.

Dans un même contexte, notre laboratoire a mis en évidence un rôle prépondérant des GS dans la stabilisation et l'accumulation de l'ARNm p21. Les GS sont, dans ce cas de figure, initialement induites par le traitement avec le composé chimiothérapeutique de type « inhibiteur du protéasome » nommé Bortezomib (Gareau et al, 2011). Le recrutement et l'accumulation de p21, dans ces granules, dépendent de la protéine CUGBP1. A l'issue du désassemblage des GS, les ARNm accumulés de p21 sont relâchés et abondamment traduits en protéine. La surproduction de p21 interfère avec la mort cellulaire, induisant ainsi une chimiorésistance.

Une autre possibilité d'activité pro-survie des GS passe par le recrutement et l'emprisonnement successif de facteurs de signalisation de mort cellulaire, au sein de ces granules. S'en suit, une fois le stress éliminé, un relâchement massif de ces facteurs. Dans ce contexte particulier de stress, l'assemblage des GS représente donc un mécanisme d'adaptation cellulaire important pouvant être qualifié de pro-survie.

Emprisonnement de facteurs associés à la mort cellulaire

La formation des granules de stress semble jouer un rôle prépondérant dans la décision de faire entrer la cellule en apoptose. Ce type de décision opère quand un stress est trop extrême et que la cellule est incapable de s'en remettre. Plusieurs études ont démontré que les GS pouvaient abriter des facteurs de régulation positive de la mort cellulaire. Ainsi, ces granules joueraient un rôle

cyto-protecteur (Baguet et al, 2007; Kwon et al, 2007; Eisinger-Mathason et al, 2008).

Par exemple, le stress sévère (c.-à-d. hypoxie, rayons ionisants, drogues génotoxiques de type Etoposide) induisant l'apoptose, active fortement la kinase MTK1. Ce processus d'activation est facilité par une interaction avec la protéine d'échafaudage **RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase1)**. La protéine RACK1 joue un rôle critique dans différents processus biologiques tels que la croissance, la migration et la différenciation cellulaire (Gibson, 2012). Cependant, au cours d'un stress dit modéré, (c.-à-d. dont les cellules peuvent récupérer), RACK1 est séquestré dans les granules de stress, en partie, grâce à sa capacité de lier les petites sous-unités 40S, constituants phares des GS. Cela limite l'activation de MTK1 et de surcroît, la mort cellulaire n'est pas enclenché (Arimoto et al, 2008). Il faut noter que la surexpression de G3BP1, qui conduit aussi à la formation des GS, inhibe également l'activation de MTK1 et augmente la résistance apoptotique (Arimoto et al, 2008).

De même, la relocalisation du TNF α receptor associated factor 2 (**TRAF2**) au sein des GS inhibe le processus de mort cellulaire encouru par la cellule lors d'une exposition prolongée au stress (Kim et al, 2005). Dans ce cas de figure, les GS sont induites par choc thermique. Et par l'intermédiaire d'une interaction eIF4GI, TRAF2 va être recruté au sein de ces granules. Cette relocalisation de TRAF2 altère l'activation de NF- κ B, un régulateur transcriptionnel clé de la réponse inflammatoire et l'apoptose (Kim et al, 2005). Ces travaux suggèrent un rôle cyto-protecteur des GS lors du processus d'inflammation menant à l'apoptose.

Un autre exemple avec la kinase **RSK2** (ribosomale S6 kinase 2) et la kinase **FAST**, qui sont deux facteurs anti-apoptotiques pouvant se relocaliser dans les GS. Ces deux facteurs se lient directement sur le Q-rich domain de TIA- 1. RSK2 est capable de réguler différentes étapes des phénomènes de prolifération et de survie cellulaire. Il modifie, par phosphorylation, des protéines cibles telles que p27kip1, TIA-1 (Carrière et al, 2008). Lors d'un stress oxydatif, RSK2 est recruté par le biais de TIA-1 au niveau des GS (Eisinger-Mathason et al, 2008). Dès lors, RSK2 ne peut plus aller dans le noyau pour y induire l'expression de la

cycline D1. La cycline D1 est un des facteurs clés régulant la phase G1 du cycle cellulaire. De plus, RSK2 (de concert avec TIA-1) peut promouvoir la formation des GS, permettant ainsi à la cellule stressée de survivre. Fait intéressant, FAST possède un domaine qui inhibe l'activation de la caspase — 3. Quand TIA-1 vient se lier sur ce domaine, ceci inactive la caspase-3 et de surcroît, la cascade de mort cellulaire associée. Ainsi, en condition de formation de GS, TIA-1 recrute FAST et inactive l'action pro-apoptotique (Li et al, 2004). Par ailleurs, RSK2 et FAST sont deux rares exemples de composants quasi — statique des GS. Ceci suggère un rôle d'échafaudage possible de ces protéines lors de l'assemblage de ces granules (Kedersha et al, 2005 ; Eisinger - Mathason et al, 2008).

L'ensemble de ces travaux a donc établi que la formation des GS peut interférer avec l'activation des voies de signalisation de mort cellulaire en séquestrant des molécules de signalisation clés, permettant ainsi aux cellules de survivre en cas de stress.

➤ **GS et Maladies neurodégénératives**

Des protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives ou neurologiques peuvent aussi se loger au sein des GS. Comme exemple, nous pouvons citer l'Ataxin -2, un facteur qui provoque une forme d'ataxie spino-cérébelleuse lorsqu'il est muté. On peut aussi retrouver la protéine SMN dont la mutation provoque l'apparition de l'amyotrophie spinale (Nonhoff et al, 2007; Hua et Zhou, 2004); de même que la huntingtine (Waelter et al, 2001) et la protéine prion (Goggin et al, 2008). Il semble également y avoir un lien entre les granules de stress et la protéine du syndrome de l'X fragile (FMRP), dont le rôle serait, entre autre, de réguler négativement le processus de traduction de l'ARNm. En effet, en période de stress, FMRP fait partie des constituants nucléateurs des GS

(Vanderklish et Edelman, 2005; Linder et al, 2008). De plus, il faut noter que les mutations dans la protéine FMRP qui causent le syndrome de l'X fragile perturbent également la formation des GS (Didiot et al, 2008).

Plus récemment, des chercheurs ont posé un lien entre formation des granules de stress, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la dégénérescence lobaire fronto-temporale. Wolozin et ses collègues ont rapporté que la protéine de liaison à l'ARN, TDP – 43 est incorporé dans les granules de stress (Liu - Yesucevitz et al, 2010). Les mutations de TDP – 43 ont émergé comme étant une cause d'un petit sous-ensemble des cas de SLA familiale et certains cas de démence fronto-temporale. En fait, TDP – 43 peut interagir avec TIA-1; à la fois directement et par l'intermédiaire de l'ARN. Dans les tissus post-mortem de personnes atteintes de SLA, par exemple, TDP – 43 colocalise également dans les « inclusions » contenant TIA- 1 et le facteur d'initiation eIF3, ce qui laisse penser que ces « inclusions » seraient des parentes des GS. Fait intéressant, Gitler et ses collègues ont rapporté que l'Ataxin-2, normalement associée à l'Ataxie, peut augmenter le risque de développement de la SLA (Elden et al, 2010). De plus, l'Ataxin – 2 est, dans certains cas de figure, un constituant des granules de stress; ce qui renforce le lien entre ces granules et la SLA.

Une preuve supplémentaire de l'implication des GS dans la SLA vient des laboratoires de Bosco et de Haas. Les deux ont constaté que les mutants de la protéine de liaison à l'ARN, nommée FUS et qui provoque la SLA familiale, se retrouve aussi dans les GS (Dorman et al, 2010; Bosco et al, 2010). Le groupe de Bosco en collaboration avec Larry Hayward, ont constaté que dans les modèles de poisson zèbre atteint de SLA, la protéine FUS est plus susceptible de se retrouver dans ces granules quand les scientifiques appliquent un stress supplémentaire, par exemple, choc thermique ou dommages oxydatifs.

Déterminer un rôle de granules de stress dans ces pathologies devient primordiales pour permettre une meilleure compréhension des dites maladies et le développement de thérapies appropriées et efficaces.

➤ **GS et Infection virale**

La formation des GS corrèle souvent avec la reprogrammation virale de la machinerie traductionnelle de l'hôte. Plusieurs types de virus sont capables d'interagir avec TIA-1, TIAR ou les GS. Chacun de ces virus utilisent, d'une façon qui leur est propre, la formation des GS. Il apparaît alors que le virus SFV puisse utiliser les GS afin de réguler l'arrêt de la synthèse des protéines de l'hôte. Plusieurs autres virus ont des liens établis avec les protéines TIA-1, TIAR ou les GS. Néanmoins, les mécanismes qui régissent leurs interactions n'est qu'au stade exploratoire. C'est le cas aussi pour le virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1), pour le virus de la stomatite vésiculeuse, le virus Sindbis et le virus de la vaccine (Li et al, 2002; Esclatine et al, 2004). Un autre exemple : le virus du Nil occidental (VNO) contient une structure ARN tige-boucle qui se lie à TIAR (Li et al, 2002). Lors de l'infection, TIAR est séquestré dans des foyers de réplication virale foyers; ce qui inhibe l'assemblage des GS (Emara et al, 2007). La liaison de TIAR est crucial pour l'infection, car la réplication du VNO est gravement compromise dans les fibroblastes dépourvus TIAR (Li et al, 2002). Comme le VNO, le virus Sendai code pour un ARN qui séquestre TIAR et inhibe l'assemblage de GS. Ces résultats confirment un rôle crucial pour TIAR dans l'assemblage des GS. Des résultats récents montrent que le poliovirus cible une protéine différente des GS afin de faciliter l'infection virale. L'infection du poliovirus amène cependant à un assemblage de courte durée des GS. La dépolymérisation des GS est notamment liée au clivage de G3BP par la protéase 3C du poliovirus. En effet, l'expression de protéines G3BP résistantes au clivage permet au GS de rester formées, entraînant alors l'inhibition de la réplication virale (White et al, 2007). Dans les cellules infectées par le virus de la forêt de Semliki (SFV), les GS sont assemblées et désassemblées d'une façon similaire lors de l'infection virale par le poliovirus (McInerney et al, 2005).

En conclusion, il faut donc retenir que les GS sont des entités activement impliquées dans les décisions « de vie ou de mort » des cellules en détresse.

Ceci est particulièrement important dans le cadre de la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies. Cependant, les événements moléculaires menant à leur formation et dépolymérisation ne sont pas encore totalement connus. Il serait donc primordial d'explorer ces mécanismes afin d'avoir une meilleure compréhension de la biogenèse des GS. Par cette connaissance, nous serions capables de développer des drogues pouvant cibler spécifiquement la formation des GS et ainsi prévenir la chimiorésistance. (Dixit Coudert et Mazroui, 2013)

CHAPITRE 2. Contexte et Objectifs de cette thèse

2.1. Contexte de la recherche

Il existe un lien fort entre la formation des GS et la chimio- et radio-résistance des cellules cancéreuses. L'assemblage de ces granules représente probablement un mécanisme d'adaptation cellulaire majeur pouvant être qualifié de pro-survie. Ce qui devient problématique dans le contexte du Cancer. Par ailleurs, des études précédentes ont démontrées l'implication des facteurs d'initiation de la traduction dans la biogénèse des GS (Kedersha et al, 1999; Mazroui et al, 2006; Ohn et al, 2008; Mokas et al, 2009). Or, la traduction est le processus qu'on cherche à réguler pendant les thérapies anti-cancer. Dans cette optique, il devient indispensable d'investiguer les mécanismes de formation des GS.

Le but de ce travail a été d'approfondir nos connaissances sur la signalisation intracellulaire qui régit la formation des GS dans le contexte du Cancer. Ceci pour améliorer notre compréhension de la biogenèse de ces granules de stress et espérer prévenir la chimiorésistance associée.

2.2. Objectif général

L'objectif général de cette thèse fut d'identifier non seulement des inducteurs de type chimiothérapeutiques mais aussi des acteurs clés de la formation des GS qui pourraient être ciblés pour empêcher l'assemblage de ces granules, sensibilisant ainsi les cellules cancéreuses aux thérapies.

2.3. Objectifs spécifiques

Projet principal

- Déterminer le rôle d'eIF4E et de ses partenaires eIF4G et 4E-BP1 dans la formation des GS.
- Détailler les mécanismes moléculaires impliquant ces facteurs dans le contexte de cellules cancéreuses chimiorésistantes.
- Définir le rôle de la voie de signalisation mTOR dans ce processus.
- Préciser l'impact de ces différents protagonistes sur le processus de chimiorésistance associée à la formation des GS au sein des cellules cancéreuses (in vitro et in ovo).

Projet connexes

Nouveaux inducteurs pour les GS

- Identifier les drogues chimiothérapeutiques pouvant induire la formation de GS dans les cellules cancéreuses.
- Déterminer les mécanismes de formation des GS induits par ces drogues
- Etablir le rôle de la formation des GS dans la chimiorésistance.

Etude exploratoire des possibles rôles de la protéine HRI

- Définir le rôle d'HRI, autre que celui de régulateur de la formation des GS, dans la réponse cellulaire face à la thérapie anti-cancer Bortezomib.
- Déterminer si, en condition de stress, il agit comme un régulateur transcriptionnel ou traductionnel de l'expression des gènes
- Extrapoler le rôle d'HRI en tant que régulateur transcriptionnel ou traductionnel de l'expression des gènes dans les cellules dénuées de stress.

CHAPITRE 3. Matériels et Méthodes

Lignées cellulaires et Culture

Les cellules issues des hépatocarcinomes Hep3B, HepG2 et Huh7 ont été obtenues du Dr. A. Calvé. La lignée Huh7 a été cultivée dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – Sigma-Aldrich) auquel on a additionné de 10 % (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS - Sigma-Aldrich), 0.25µg/ml d'Amphotéricin B (Wisent) et du MEM non essentiel amino acids 100X (Wisent). De plus, le milieu fut également supplémenté en pénicilline (100 Unités/ml) et en streptomycine (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) afin d'annihiler les risques de contamination bactérienne. Les lignées Hep3B et HepG2 ont été cultivées dans du Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM – Sigma-Aldrich) auquel on a additionné de 10 % (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS - Sigma-Aldrich) et 0.25µg/ml d'Amphotéricin B (Wisent). De plus, le milieu fut également supplémenté en pénicilline (100 Unités/ml) et en streptomycine (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) afin d'annihiler les risques de contamination bactérienne. Les cellules du cancer de la prostate PC3 ont été fournies par le Dr. Vincent Fradet (Université Laval). Ces différentes lignées ont été cultivées dans du F-12K Medium (F-12KM – Sigma-Aldrich) auquel on a additionné de 10 % (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS - Sigma-Aldrich). De plus, le milieu fut également supplémenté en pénicilline (100 Unités/ml) et en streptomycine (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) afin d'annihiler les risques de contamination bactérienne. Les cellules du cancer du sein T47D et MDA-MB-231 ont été obtenues du Dr. R.C.Gaudreault (Université Laval). Les cellules issues du cancer du sein MCF-7 et Hs 578T de même que les cellules HeLa : lignée cellulaire cancéreuse provenant d'une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus, ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, ATCC). Les cellules Mouse Embryonic Fibroblast (MEF), la lignée MEF présentant

une variante mutée de la protéine eIF2 α qui ne peut être phosphorylée, eIF2 α S51A/S51A (EIF2AA) (Scheuner et al. 2001), Toutes les lignées cellulaires évoquées précédemment furent cultivées sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂, dans des incubateurs à 37°C. Les lignées cellulaires furent passées 2 fois par semaine ; à l'aide de la trypsine (500 ng/ml) (GIBCO by life technologies), les cellules étaient décollées et passées en les diluants au 1:10. Les cellules ont subi 10 à 15 cycles de passage après décongélation.

Traitements

Les cellules sont cultivées pour atteindre une confluence optimale de 70% au moment du traitement; que l'on soit dans un pétri de 10cm ou une plaque à 6 puits. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Puis elles sont ré-incubées dans du milieu complet de culture frais dans l'attente d'être traitées. Les traitements se font selon les concentrations indiquées pour chacune des drogues, dépendamment du type cellulaire et de l'expérience en cours (Se référer au chapitre Résultats). Le temps de traitement est dépendant de la drogue appliquée sur les cellules et du type d'expériences menées (Se référer au chapitre Résultats). Le temps du traitement, les cellules sont maintenues dans une atmosphère à stérile à 37°C et 5% de CO₂. A la fin du traitement, les cellules sont rapidement observées au microscope optique puis lavées avec du PBS IX froid et fixées pour des analyses telles que l'immunofluorescences ou directement récoltées pour en extraire les protéines et être analysées par Immunobuvardage.

Drogues

L'Arsenite provient de Sigma-Fisher. Cette drogue est dissoute dans de l'eau, à un stock de 100mM, et stocké à -20°C. Bortezomib provient de LC Laboratories (Woburn, MA). Cette drogue est dissoute dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à un stock de 65mM, stocké à -20°C et utilisé au cours des 2 semaines qui suivent sa solubilisation. Sorafenib provient de Selleckbio (Cedarlane). Cette drogue est dissoute dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à un stock de 10mM, stocké à -20°C et utilisé au cours des 4 semaines qui suivent sa solubilisation.

Lapatinib provient de Selleckchem (Cedarlane). Cette drogue est dissoute dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à un stock de 10mM, stocké à -20°C stocké à -20°C et utilisé au cours des 4 semaines qui suivent sa solubilisation. PP242 fut obtenu de Selleck Chemical (Burlington, ON). Torin-1 provient de Tocris Bioscience (Bristol, UK). 4EGI-1 fut acheté chez Alexis Biochemical (Brockville, ON). Tous ces composés furent dissouts dans du DMSO et stocké à -20°C stocké à -20°C et utilisé au cours des 4 semaines qui suivent leur solubilisation ainsi que recommandés par les fabricants. Lors des traitements, les cellules (qui avaient atteint une confluence optimale de 70%) furent d'abord incubés avec du DMEM contenant, dépendamment du type cellulaire et de l'expérience, 3% à 5% de FBS pendant 2h avant l'ajout des drogues citées précédemment.

Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre stériles de 18 x 18 mm dans des plaques de 6 puits. Après traitement et incubation des cellules comme indiqué dans chaque expérience, elles sont lavées deux fois avec du PBS 1X froid. Ensuite, les cellules sont fixées/perméabilisées dans une solution d'Acétone: Méthanol (7:3) durant 15-20 min à -20 °C. Les lamelles sont ensuite séchées à l'air libre et réhydratées dans du PBS 1X. Après leur réhydratation dans du PBS 1X, les cellules sont incubées à température ambiante (TP) pendant 30 min-1h dans du PBS contenant 1 % d'albumine bovine (PBS 1x-BSA 1%) afin de bloquer les sites non spécifiques. On réalise alors 3 lavages de 5 minutes dans du PBS-Tween 0,1 %. Suite à cette fixation et perméabilisation, les cellules sont ensuite recouvertes d'une solution contenant des anticorps primaires dilués dans 0,1 % Tween-20/PBS (PBST) pour 1 h 30 à 2h à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été lavées 3 fois 5 min dans du PBS-Tween 0,1 % à température ambiante. Ensuite, les cellules sont incubées 1 heure dans une dilution appropriée de l'anticorps secondaire (qui peut-être un anti-mouse IgG ou anti-

rabbit IgG couplés avec le fluorophore Alexa Fluor de longueur d'onde d'absorption maximale appropriée (-488 ou -594)), et ce, dans l'obscurité. A l'issue de ce marquage avec l'anticorps secondaire, les cellules sont de nouveau lavées 3 fois 5 min avec dans du PBS-Tween 0,1 % à température ambiante. Les noyaux sont ensuite mise en contact avec une solution de Dihydrochlorure de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (50 ng/ml) (Sigma-Aldrich) dilué au 1 : 20 000 dans du PBS-Tween 0,1 % pendant 5 minutes. Les molécules de DAPI vont se lier fortement à l'ADN et assurer sa détection en émettant une fluorescence bleue brillante observable au microscope à fluorescence. Finalement les cellules sont lavées trois fois avec du PBS-Tween 0,1 % pendant 5 minutes. Puis, l'excès de liquide est retiré des lamelles et ces dernières sont déposées sur des lames de verre de manière à ce que les cellules baignent dans la solution protectrice qui va inhiber les risques de photo-blanchissement des fluorochromes (Vectashield) (Vector Laboratories inc.). Les lamelles sont scellées aux lames avec du vernis à ongle. Les cellules sont ensuite visualisées à l'aide du microscope confocal à fluorescence ZEISS (système Zeiss LSM 700 confocal) en utilisant un objectif à immersion dans l'huile de 40X ou 63X. Les images sont ensuite exploitées et configurées pour publication dans Adobe Photoshop CS5®. Dans le contexte d'une immunofluorescence pour détecter la protéine eIF4E, les étapes de fixation et de blocage diffèrent. Ce protocole est retrouvé dans la section Materials and Methods du chapitre 1 des Résultats.

Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide

a- Extraction des protéines

Après les traitements spécifiques, les cellules sont lavées avec du PBS 1X froid. Ensuite, les échantillons cellulaires sont récoltés puis solubilisés dans du tampon de Laemmli sample buffer 2X (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (p/v) SDS, 0,2 % (p/v) Bromophenol Blue, 20 % (v/v) Glycérol, 200 mM DTT, 200 mM β -mercaptoéthanol). Enfin, ces lysats cellulaires chauffés à 100°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines puis passés à la seringue pour optimiser la lyse.

b- Coloration au bleu de Coomassie et Quantification

Les protéines extraites sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE). La séparation des protéines et la migration se déroule de la façon suivante : On dépose chaque échantillon protéique dans les puits d'un gel de concentration (5 % (4,95 % (p/v) acrylamide, 0,07 % (p/v) bis-acrylamide, 130 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (p/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,05 % (p/v) APS), qui surmonte un gel de résolution/séparation (12 % (11,46 % (p/v) acrylamide, 0,54 % (p/v) bis-acrylamide, 390 mM Tris pH 8,8, 0,1 % (p/v) SDS, 0,08 % (v/v) TEMED, 0,05 % APS). Les échantillons vont ensuite migrer dans une solution de tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-Base, 250 mM Glycine, 0,1 % (p/v) SDS) à un courant de 20 mA/gel, jusqu'à la sortie, du gel, du front de migration. Au final, les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire. Ensuite, dans un but de quantification des protéines, le gel est incubé dans une solution de bleu de Coomassie (0,04 % Coomassie brillant blue R, 40 % méthanol, 10 % acide acétique) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Le gel, ainsi coloré, est ensuite décoloré dans une solution de décoloration (25 % méthanol, 10 % acide acétique) jusqu'à ce qu'il soit complètement transparent. Les bandes colorées (manifeste des protéines qui ont été séparé sur ce gel) sont ensuite quantifiés en utilisant

c-Immunobuvardage :

c.1- Migration

Dès lors que les protéines de chaque échantillon sont quantifiées, on dépose et sépare à nouveau les extraits par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE). On dépose chaque échantillon protéique dans

les puits d'un gel de concentration (5 % (4,95 % (p/v) acrylamide, 0,07 % (p/v) bis-acrylamide, 130 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (p/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,05 % (p/v) APS). Ce gel de concentration surmonte un gel de résolution/séparation dont la pourcentage de polyacrylamide va varier en fonction du poids moléculaire de la protéine étudiée (X% acrylamide, 0,54 % (p/v) bis-acrylamide, 390 mM Tris pH 8,8, 0,1 % (p/v) SDS, 0,08 % (v/v) TEMED, 0,05 % APS). Les échantillons vont ensuite migrer dans une solution de tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-Base, 250 mM Glycine, 0,1 % (p/v) SDS) à un courant de 20 mA/gel, jusqu'à la sortie, du gel, du front de migration. Au final, les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire.

c.2- Électrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Après migration, le gel de polyacrylamide est déposé sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm (BioRad) et le montage est inséré au sein d'une cuve de transfert contenant un tampon de transfert (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20 % méthanol). L'appareillage est alors soumis à un courant de 100 mA toute la nuit afin de permettre le transfert des protéines.

c.3- Immunodétection des protéines

Les protéines maintenant transférées et fixées sur la membrane de nitrocellulose sont ensuite révélées grâce à une solution de Rouge Ponceau S (0,5 % (p/v) Ponceau S (Invitrogen), 1 % (v/v) acide acétique) pendant 5 minutes. Notre but est de vérifier la quantité et la qualité du transfert. Ensuite, la membrane est rincée avec de l'eau nanopure puis incubée dans une solution de blocage (5 % (p/v) lait en poudre écrémé, 0,1 % (v/v) Tween 20, PBS) pendant 30 minutes, sous agitation. Après 3 lavages de 5 minutes dans une solution de lavage PBS-Tween 20 (0,1 % (v/v) Tween 20, PBS), la membrane est ensuite incubée, à température ambiante, pendant un temps varié dépendamment de l'anticorps, avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS-0,1 % Tween 20. Après trois lavages au PBS-Tween d'une durée totale de 15 minutes, la membrane est mise en présence et incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire approprié couplé au HRP (horseadish peroxydase. Trois derniers lavages de 10 minutes

sont réalisés sur la membrane avec du PBS-Tween. Enfin, on révèle le signal protéique de type chimiluminescent en incubant la membrane, pendant 1 minute, avec le réactif ECL (electrochemoluminescence) Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare). Puis, on expose la membrane sur des films XAR™ (Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF) qu'on ira développer ultérieurement.

Surexpression protéique

Les surexpressions protéiques sont réalisées de manière transitoire à l'aide du kit de transfection Effectene® de QIAGEN et selon les recommandations protocolaires du fabricant. En premier lieu, les cellules sont mise en culture jusqu'à atteindre une confluence de 70 %. Ensuite, le complexe de transfection/ADN est ajouté au milieu de culture pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite lavées. Les complexes de transfection sont ainsi éliminés puis les cellules sont supplémentées avec du milieu frais pour 24 heures supplémentaires. Finalement les cellules seront soit traitées avec la drogue appropriée à l'expérience en cours ; soit récoltées ou fixées selon la manipulation. Généralement, les vecteurs plasmidiques utilisés proviennent de collaborateurs ou ont été commandés chez ORIGENE puis amplifiés grâce au kit QIAfilter Plasmid Midi Kit de QIAGEN.

Cytométrie en flux – Analyse de la Mort Cellulaire

Le test d'affinité à l'Annexine V est utilisé dans le cadre de la détection précoce de l'apoptose. En effet, l'annexine V est une protéine de faible poids moléculaires qui possède une forte affinité pour la phosphatidylsérine. Ainsi, couplé à un marqueur fluorescent, l'annexine V permet de détecter les cellules en apoptose. En effet, l'in des 1ers évènements de l'entrée en apoptose d'une cellule est l'exposition de la PS au milieu extracellulaire. Ce test est généralement complété par l'addition d'un agent intercalant (ici, l'Iodure de Propidium) qui ne pénètre

dans les cellules que lorsque la membrane plasmique est altérée, c'est-à-dire en phase tardive de l'apoptose ou lors de la nécrose.

On peut alors distinguer les cellules en nécrose de celles en apoptose selon les critères suivants :

- AnV- / PI- → cellule vivante ;
- AnV- / PI+ → débris nucléaires ;
- AnV+ / PI- → phase précoce d'apoptose ;
- AnV+ / PI+ → phase tardive d'apoptose et ou nécrose.

Au niveau protocolaire, en premier lieu, les cellules sont mise en culture dans des pétris de 10 cm ou des plaques à 6 puits. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 80%, on va les traiter ou non selon les besoins de l'expérience. Ultiment, le surnageant (SN) est éliminé. Ensuite, les cellules adhérentes sont délicatement lavées avec 3 à 5 ml de PBS. On décolle les cellules avec de la trypsine à 37°C/5% de CO₂ pendant 5 à 10 minutes. Ensuite, pour stopper l'action de la trypsine (500 ng/ml) (GIBCO by life technologies), on ajoute 2 à 5 ml de milieu DMEM et on transfère le tout dans un Falcon posé sur glace. On centrifuge, à température ambiante, pendant 5 à 10 minutes à 1000 RPM. On lave le culot avec 2 ml de PBS 1X froid et recentrifuge. On relave le culot avec 1 ml de PBS 1X froid puis on transfère dans un eppendorf. Ensuite on centrifuge 5 minutes à 1000 RPM à 4°C. On défait ensuite le culot de cellules dans 500 µl de 1X binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) pour finalement transférer le tout dans une collection de tubes FACS (Fluorescence-activated cell sorting – cytométrie en flux) clairement identifiées en fonction de l'expérience. La constitution des échantillons se fait selon les modalités énoncées ci-dessous ; par exemple, la condition non traitée (calibration de l'appareil), a-100ul de notre suspension cellulaire (sans additifs),

b-100ul de notre suspension cellulaire + 4ul PI,

c-100ul de notre suspension cellulaire + 4ul Annexin V,

d-100ul de notre suspension cellulaire + 4ul PI+4ul Annexin V

Et pour les échantillons expérimentaux :

e-100ul de notre suspension cellulaire + 4ul PI+4ul Annexin V

On mélange délicatement les échantillons et incube à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. On met les tubes contenant les échantillons dans la glace. A chaque tube, on ajoute 400 µl de 1X binding buffer et on homogénéise. Après avoir scellé les tubes qu'on maintient sur glace, on va réaliser les analyses des échantillons au laboratoire de cytométrie en flux du CHUL de Québec.

Cytométrie en flux – Analyse de la taille des cellules

En premier lieu, les cellules sont mise en culture dans des pétris de 10 cm. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 80%, on les récolte pour analyse. Ultiment, le surnageant (SN) est éliminé. Ensuite, les cellules adhérentes sont délicatement lavées avec 3 à 5 ml de PBS. On décolle les cellules avec de la trypsine à 37°C/5% de CO₂ pendant 5 à 10 minutes. Ensuite, pour stopper l'action de la trypsine (500 ng/ml) (GIBCO by life technologies), on ajoute 2ml de milieu DMEM et on transfère le tout dans un Falcon posé sur glace. On centrifuge, à température ambiante, pendant 5 à 10 minutes à 1000 RPM. On lave le culot avec 2 ml de PBS 1X froid et recentrifuge. On relave le culot avec 1 ml de PBS 1X froid puis on transfère dans un eppendorf. Ensuite on centrifuge 5 minutes à 1000 RPM à 4°C. On défait ensuite le culot de cellules dans 500 µl de PBS 1X froid pour finalement transférer le tout dans une collection de tubes FACS (Fluorescence-activated cell sorting – cytométrie en flux) clairement identifiées en fonction de l'expérience. On met les tubes contenant les échantillons dans la glace. Après avoir scellé les tubes qu'on maintient sur glace, on va réaliser les

analyses des échantillons au laboratoire de cytométrie en flux du CHUL de Québec.

Cytométrie en flux – Cycle cellulaire

Ce protocole est décrit dans la section Materials and Methods du chapitre 1 des Résultats.

Analyse des polyribosomes

Ce protocole est parfaitement décrit dans la section Materials and Methods du chapitre 1 des Résultats. Pour plus d'informations, merci de vous reporter au tutoriel «**Analysis of translation initiation by polysome profile analysis** sur le site « JOVE » réalisé mon équipe de recherche et moi-même.

Préparation de l'ARN et analyse par Micro-Array

a- Lignées stables HeLa shNE, shHRI

La réalisation de ce micro-array fit appel à 2 types de lignées cellulaires particulières : HeLa shRNA non effectrices (shNE) et HeLa shRNA HRI, dont la mise en place fut réalisée par mes collègues Marie-Josée Fournier et David Martel.

Le protocole est ainsi expliqué :

Le même protocole de transfection transitoire qui initie la création des lignes stables HeLa shRNA non effectrice (shNE) et HeLa shRNA HRI utilise le kit de transfection Effectene® de QIAGEN et suit les recommandations protocolaires du fabricant. Ce protocole de transfection est réalisé en utilisant les plasmides shRNA (spécifique à chaque ARN visé, ici : non effecteur, HRI) du kit HuSH™ commandés chez ORIGENE. Après 24 heures, la drogue de sélection (puromycine) est ajoutée au milieu selon la concentration normalement létale

précédemment établie (1ug/ml). Cette concentration a été établie en réalisant une courbe de survie cellulaire. Ainsi, j'ai appliqué à plusieurs populations cellulaires différentes concentrations de puromycine et après avoir observé la mort cellulaire après 24 heures, j'ai pu établir la concentration létale de la drogue pour cette période de temps. Le milieu supplémenté de la drogue est changé tous les deux jours et ce, jusqu'à l'obtention de clones bien définis et visibles à l'oeil, exprimant de fait et de manière stable le plasmide shRNA. Chaque clone ayant résisté au traitement létal de puromycine est considéré comme ayant acquis le gène de résistance associé à la construction HuSH™ et est ensuite repiqué un à un grâce à une micropipette. Ces clones sont cultivés de manière indépendante afin d'obtenir différentes populations uniques et ce, dans un milieu supplémenté de la drogue de sélection, mais à demi-concentration (0,5ug/ml). Un criblage de chacun des clones en western blot est ensuite effectué afin de vérifier l'efficacité de déplétion. Les clones présentant les meilleures déplétions sont conservés. (Dixit Martel D, 2013)

b- Extraction de l'ARN total et analyse par Micro-Array

Les cellules ont d'abord subi ou non un traitement au Bortezomib, 2uM pendant 4h puis elles ont été lavées délicatement avec du PBS 1X. Ensuite, les cellules ont été rapidement recueillies et lysées à 4°C avec un tampon de lyse adapté à l'extraction d'ARN « Buffer RLT Plus » fourni par le kit RNeasy Plus minikit de QIAGEN en suivant les instructions du protocole établi par le fabricant.

Elles sont ensuite lysées par 15 passages à travers une seringue de type 1cc U100 Insulin Syringe 28 G1/2. L'isolation de l'ARN total se fait par le biais du kit RNeasy Plus minikit de QIAGEN en suivant les instructions du protocole établi par le fabricant. La qualité et quantité de l'ARN total a été mesuré avec l'outil Nanodrop ND-1000 spectrophotomètre (Nanodrop Technologies Inc., DE, USA). L'intégrité de l'ARN a été évaluée par électrophorèse capillaire en utilisant le Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada).

Les analyses par Micro-Array ont été réalisées en utilisant la technologie Affymetrix de puce à ADN Human Gene 1.0 ST. La puce interroge 28 869 gènes avec 764 885 sondes distinctes. La conception de la puce à ADN Human Gene 1.0 ST est basée sur le « March 2006 human genome sequence assembly (UCSC HG18, NCBI build 36) » avec une couverture complète de RefSeq, Ensembl et putative complete CDS (coding sequence) GenBank transcripts. Les puces ont été traitées selon le protocole standard associé à la technologie Affymetrix. En bref, l'ARN total (150 ng par échantillon) a été marqué à l'aide du kit de Ambion WT expression et Affymetrix GeneChip® Terminal labeling WT kit, puis hybridé aux sondes des puces tels que décrits par le fabricant (Affymetrix, Santa Clara, CA). Le cocktail d'hybridation contenant les ADNc fut incubé une nuit à 45 ° C sous agitation dans un four à hybridation. Après 17 ± 1 h d'hybridation, le cocktail est éliminé et les puces sont lavées et colorées dans une station 450 GeneChip fluide, selon le protocole d'Affymetrix. Les puces à ADN sont numérisées et analysées à l'aide des logiciels « Affymetrix GCS 3000 7G » et « Affymetrix Expression Control Software » (Affymetrix, Santa Clara, CA), pour produire les fichiers d'intensité.

L'analyse des données, la soustraction du bruit de fond, et la normalisation de l'intensité ont été effectuées en utilisant le logiciel « Robust Multiarray Analysis » [Irizarry et al, 2003]. L'expression différentielle des Gènes et le taux de fausses découvertes ont été estimés à partir de t-test ($P < 0,05$) et corrigés en utilisant l'approche Bayes [Benjamini et al, 2010]. L'analyse des données, la classification hiérarchique, et l'ontologie des gènes a été réalisée en utilisant l'OneChanelGUI to extend affylmGUI capacités de l'interface graphique [Wettenhall et al, 2006] et

Partek Genomics Suite, version 6.5 (Partek Inc., St. Louis, MO) avec l'analyse de l'analyse de variance. (Adapté de Bourdieu et al, 2013)

c- Confirmation des ARNs détectés par micro-array.

Les cellules HeLa shRNA non effectrice (shNE) et HeLa shRNA HRI ont d'abord subi ou non un traitement au Bortezomib, 2uM pendant 4h puis elles ont été lavées délicatement avec du PBS 1X. L'ARN total fut extrait comme décrit ci-dessus. Ensuite, les PCRs reverse transcriptase (RT-PCRs) ont été réalisées en utilisant le kit de transcription inverse Quantitect (Qiagen). Chaque réaction a été réalisée en mélangeant 2 ul d'ARN à 500 ng / ul, 10 ul d'eau sans RNase, 2 pl de tampon gDNA Wipeout 7 x, 4 pi de Quantiscript RT Buffer 5 x, 1 pl de RT Primer Mix et 1 pi de Quantiscript transcriptase inverse. Les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant le Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) dans un volume total de 25 ul: 12.5 uL de PCR Master Mix, 0,67 ul d'amorce avant à 3,75 uM, 0,67 ul d'amorce inverse à 3,75 uM, 9,2 ul d'eau déminéralisée et 2 ul de RT-PCR. Les réactions ont été exécutés et les données ont analysées avec l'aide du système 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) avec un programme en 4 étapes: Première étape: 20sec d'incubation à 50 ° C; Deuxième étape: incubation de 10 min à 95 ° C, suivie d'une réaction en 2 étapes à la Troisième phase: 95 ° C x 15 s et 55 ° C x 60 s pendant 40 cycles, et une Quatrième étape qui consiste en une réaction en 3 étapes (95 ° C x 15 s, à 60 ° C x 20 s et 95 ° C x 15 s). Pour détecter et amplifier l'ARNm HRI, les paires oligonucléotidiques utilisées étaient les suivantes: 5'-GCCCTGATCAGCCAAGTAAAA-3 '(amorce sens), et 5'-TCTGGACGAGTATGTGTTGGTG-3' (amorce inverse). Pour détecter et amplifier l'ARNm du glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), les paires oligonucléotidiques utilisées étaient les suivantes: 5'-ACGACCACTTTGTCAAGCTC-3 '(amorce sens), et 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' (amorce inverse).

Nous avons utilisés des primers ou paires oligonucléotidiques commerciaux (Invitrogen) spécifiques à chaque gène pour détecter les ARNms des gènes sélectionnés, jugés pertinent, pour confirmer l'analyse par micro-array.

CHAPITRE 4. Résultats

Partie 1. Nouveau rôle de la voie oncogénique mTOR-eIF4E dans la formation des granules de stress et la résistance cellulaire cancéreuse associée

Cet article fut publié dans le journal "Molecular and Cellular Biology » (<http://mcb.asm.org/>); dans le volume 33, issue 11 de Juin 2013 (<http://mcb.asm.org/content/33/11.toc>). Cette étude est avant tout un travail d'équipe qui sans l'acharnement et le dévouement de chacun, n'aurait pu voir le jour. J'ai effectué, participé ou collaboré au design des expériences; je me suis principalement concentrée sur l'élaboration des manipulations faisant appel à la technique de cytométrie en flux (figures 2, 4 et 5; figures supplémentaires 7) et à la technique d'extraction des polysomes (figure supplémentaire 4). J'ai effectué, participé ou collaboré à l'ensemble des expériences présentées dans les figures principales de l'article et les figures supplémentaires. J'ai travaillé en collaboration avec Marie-Josée Fournier et Dr. Rachid Mazroui pour réaliser les immunofluorescences de la figure 1, de la figure 2, de la figure 3, de la figure 4 et de la figure 5; mais aussi pour réaliser les immunofluorescences des figures supplémentaires 1, 2, 3, 5 et 6. Il en est de même pour les analyses statistiques qui en découlent. J'ai aidé à la réalisation des westerns blots présent dans les figures de cet article et les figures supplémentaires. Cependant, les expériences de Cap-Binding Assays ont été menées par Samia Mellaoui, Pauline Adjibade et Marie-Josée Fournier. De mon côté, j'ai participé à leur interprétation. Les expériences d'analyse de la mort cellulaire et d'analyse du cycle cellulaire par FACS furent réalisées par moi-même. Marie-Josée Fournier mena les expériences de Q-RT-PCR qui sont présentées dans cet article. Les résultats « in ovo » de la figure 6 furent conjointement réalisés avec l'aide du Dr. Gaudreault, Marie-France Coté et Cristina Gareau. J'ai participé à la reproduction de ces résultats « in ovo ». J'ai contribué à l'écriture de l'article en écrivant la 1ère version du matériel et méthodes, section « Polysomes preparation » et en participant aux remaniements et corrections de l'ensemble de l'article; ceci sous la direction du

Dr. Rachid Mazroui.

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,^a Marie-France Côté,^b Nahum Sonenberg,^c René C. Gaudreault,^b Rachid Mazrouia

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

Laëtitia Coudert and Marie-Josée Fournier contributed equally to this article.

Received 12 November 2012 Returned for modification 19 December 2012

Accepted 20 March 2013

Published ahead of print 1 April 2013

Address correspondence to Rachid Mazroui,

rachid.mazroui@crsfa.ulaval.ca.

1.1. Résumé

Les Granules de stress (SG) sont des corps cytoplasmiques multimères à ARN qui se forment dans des conditions de stress, connues pour inhiber la traduction cap-dépendante. Les SG contiennent des facteurs d'initiation de la traduction, des protéines liant l'ARN et des molécules de signalisation. Les SG sont connus pour inhiber les voies apoptotiques, contribuant ainsi à la chimio- et radiorésistance dans les cellules tumorales. Cependant, comment la formation des granules de stress implique les voies de signalisation oncogéniques est actuellement peu connu. Nous rapportons ici un nouveau rôle de la voie mTORC1-initiation eucaryote facteur 4E (eIF4E), un régulateur clé de l'initiation de la traduction cap-dépendante des facteurs oncogènes, dans la formation SG. mTORC1 conduit spécifiquement la formation des SG médiée par eIF4E et ce, à travers la phosphorylation de 4E-BP1, un facteur clé connu pour inhiber la formation des interactions eIF4E-eIF4GI dépendants de la kinase mTORC1. Perturber la formation des SG par inactivation de la kinase mTOR avec son inhibiteur spécifique PP242 ou par déplétion d'eIF4E ou eIF4GI va bloquer la voie anti-apoptotique p21 associé à la formation des SG. Enfin, PP242 sensibilise in vitro les cellules cancéreuses à la mort et inhibe la croissance des tumeurs chimiorésistantes in vivo. Ce travail met donc en évidence un nouveau rôle de la voie oncogénique mTORC1-eIF4E, à savoir la promotion de la formation de SG anti-apoptotiques.

1.2. 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.

1.3. Introduction

When exposed to environmental stress, cells rapidly activate pathways that induce a coordinated response of mRNA translation and turnover designed to protect cells against stress induced damage and promote their survival. One of these pathways involves the formation of stress granules (SG). These cytoplasmic RNA bodies are induced by a number of stress inducers such as ionizing radiation (1), hypoxia (2), viral infection (3, 4), and anticancer drugs, including proteasome inhibitors (5–7). Since such stress-inducing SG inhibit translation initiation, it is thought that SG represent sites where translation of specific mRNAs is repressed (8, 9). In addition to mRNAs and associated proteins, these foci also contain small ribosomal subunits (40S) and eukaryotic

translation initiation factors (eIFs), including eIF4E and eIF4GI (8, 9), as well as signaling molecules such as RACK1 and TRAF2 which are known to impact on cell death (10, 11). Induction of SG upon exposure to several stress types can lead to resistance of tumor cells to apoptosis, a phenomenon which appears to involve several mechanisms acting in tandem. The formation of SG under conditions of hypoxia has been shown to inhibit apoptosis mediated by etoposide (10). This effect was attributed to sequestration of the signaling scaffold protein RACK1 into SG, thus leading to the suppression of mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent apoptotic pathways. Furthermore, SG promote tumor cell survival during radiotherapy by preventing the degradation of specific mRNAs encoding key hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)-regulated survival cytokines, thereby leading to their upregulation (1). Recent yeast studies have described the induction of SG formation by the anticancer drug doxorubicin (12), and we have described formation of SG in human cancer cells induced by Bortezomib (Velcade) (5). This FDA approved drug is clinically efficient for the treatment of myelomas and other hematological malignancies (13–15). Solid tumors of various histological origins generally display resistance to this proteasome inhibitor (13–17), and it was observed that such chemoresistance may be associated with the upregulation of the antiapoptotic protein p21 via a mechanism involving the stabilization of p21mRNA within SG (6). Targeting SG formation might thus contribute to suppress resistance to proteasome inhibitors at least in part by preventing SG-mediated p21 upregulation. mTOR controls a key signaling pathway that promotes cell survival and tumorigenesis by stimulating cap-dependent translation of oncogenes and growth factors. The mTOR signaling functions are mediated by two complexes, mTORC1 and mTORC2 (18, 19). mTORC1 and mTORC2 share several components and contain unique proteins (20–26). The defining component of mTORC1 is Raptor, which regulates its assembly (27, 28). mTORC1 is a well-characterized rapamycin-sensitive complex that is activated by growth factor stimulation via the PI3K-AKT pathway. Activated mTORC1 kinase upregulates protein synthesis by phosphorylating key regulators of mRNA translation (29), including 4E-BP1, a binding partner of the cap-binding protein eIF4E. eIF4E is the best-characterized translation initiation factor known to be targeted by mTOR to promote translation of specific

oncogenes leading to tumorigenesis (30). eIF4E is responsible for the early recognition of mRNAs by binding to their 5'-m⁷GpppN cap structure (31), an interaction which is further enhanced by the scaffolding protein eIF4GI and thus stimulates formation of the cap-binding eIF4F complex (32, 33). Binding of 4E-BP1 to eIF4E competes against eIF4E-eIF4GI associations (32, 34) to disrupt eIF4F complexes, thereby counteracting the translation-promoting activity of eIF4E (35–38). mTORC1-mediated phosphorylation of 4E-BP1 releases eIF4E from 4E-BP1, thus activating translation initiation and inducing cell growth and survival (39–42). In cancer cells, free eIF4E levels rise upon increases in mTORC1 signaling or eIF4E expression, which trigger tumorigenesis (30, 43–45). Consequently, targeting mTORC1 signaling inhibits eIF4E activity and associated tumorigenesis (39, 40, 42, 46, 47). This central role of mTOR in controlling key cellular growth and survival pathways has sparked interest in developing mTOR inhibitors that could be used in cancer therapy. Unlike rapamycin which influences mTOR enzymatic activity indirectly by binding to a domain distinct from the kinase active site, the recently described TOR kinase domain-targeted mTOR inhibitors (or TORKinibs) pp242 and torin 1 are two ATP-competitive inhibitors of mTOR (48, 49) that bind directly to the mTOR kinase domain and suppress its activity. Unlike rapamycin, which partially interferes with the activity of mTORC1, pp242 and torin 1 efficiently inhibit mTORC1-dependent eIF4E activation (48–52). For purposes of cancer therapy, TORKinibs are thus considered to be promising agents that might be used to target the mTORC1-eIF4E oncogenic pathway (48–52). We show here that inactivating the mTORC1-eIF4E pathway impairs SG formation and sensitizes cancer cells to Bortezomib induced cell death in vitro and inhibits the growth of Bortezomib chemoresistant tumors in vivo. These results identify a novel eIF4E-based mode of SG assembly and suggest a novel role for the mTORC1 pathway in SG formation via eIF4E through phosphorylation of 4E-BP1.

1.4. Materials and methods

Cell lines and tissue culture.

HeLa cervical cancer cells and MCF-7 and Hs578T breast cancer cells as well as N2a neuroblastoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). HeLa cells that stably express either short hairpin RNA (shRNA) control or shRNA p21 were generated using HuSH-29 shRNA vectors purchased from OriGene. Cells were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin (all supplements from Sigma-Aldrich).

Antibodies.

Phospho-specific anti-eIF2 γ , pan-anti-eIF2, anti-4EBP1, anti-phospho-4EBP1, anti-eIF4GI, anti-mTOR, and anti-caspase-3 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-FMRP was previously described (6), and anti-FXR1 was obtained from Edward Khandjian (Laval University). Anti-G3BP1 and anti-histone 3 were kindly provided by Imed Gallouzi (McGill University) and Jean-Yves Masson (Laval University), respectively. Anti-eIF4E was obtained from BD Bioscience. Antitubulin and anti-Raptor were purchased from Abcam. Antip21 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA).

Chemicals and treatment.

PP242 was obtained from Selleck Chemicals, torin 1 was purchased from Tocris Bioscience, 4EGI-1 was purchased from Alexis Biochemicals, and Bortezomib was obtained from LC Laboratories. All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C as recommended by the suppliers. For treatment, cells (at 60% to 70% confluence) were first incubated with DMEM containing 3% to 5% FBS for at least 2 h before addition of drugs. siRNA

experiments. All specific small interfering RNAs (siRNAs) and nontargeting control siRNAs were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). siRNA transfections were performed essentially as described previously (6, 53), using HiPerFect reagent (Qiagen) and following the manufacturer's protocol. Twenty-four hours before transfection, cells were plated at a density leading to 60% to 70% confluence at the time of transfection. For a 6-well plate, annealed duplexes were used at a final concentration of 10 nM. Forty-eight hours posttransfection, cells were treated with siRNA (5 nM) for an additional 48 h. Cells were then either fixed and processed for immunofluorescence or harvested for protein extraction. The sequences of the siRNAs used are as follows:

for siRNAeIF4E- 1, 5'-GGACGAUGGCUAATTACAT-3' (84, 85); for siRNAeIF4E-2, 5'-ACACATATAGGGAGGGTAT-3'; for siRNA-mTOR-1, 5'-CATAAGAGGCAGAAGGCAA-3'; for siRNA-mTOR-2, 5'-GCAAAGATCTCATGGGCTT-3'; for siRNA-4EBP1-1, 5'-GACATAGCCCAGAAGATAA-3'; for siRNA-4EBP1-2, 5'-CCGGGAGGTACCAGGATCA-3'; for siRNA-eIF4GI-1, 5'-TGAGAAAGGAGGAGAGGAA-3'; for siRNAeIF4GI- 2, 5'-GGGCTTAGCTGGAAGGAAT-3'; for si-Raptor-1, 5'-TGGCTAGTCTGTTTCGAAA-3'; for si-Raptor-2, 5'-GGGAGAAGCTGGATTATTT-3'; and for si-4E-BP2, 5'-GGGAGGAACTCGAATCATT-3'.

Immunofluorescence.

Following fixation and permeabilization (20min in 3.7% paraformaldehyde at room temperature followed by a 15min immersion in MeOH at -20°C), cells were incubated with primary antibodies diluted in 0.1% (vol/vol) Tween 20-phosphate-buffered saline (PBST) for 2 h at room temperature. After being rinsed with PBST, cells were incubated with goat anti-mouse/anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibodies conjugated with the Alexa Fluor dye of the appropriate

maximum absorption wavelength (-488 or -594) for 1 h, washed, and then mounted.

To detect 4E-BP1 by immunofluorescence, we used a protocol previously described by Svitkin et al. (84). Proteins were visualized using an LSM 700 confocal laser scanning microscope (Zeiss) controlled with ZEN 2009 software for image acquisition and analysis. Images were acquired using the following settings: 63X oil objective (zoom, 1.0), 0.06 μm for pixel size, and 1.00 Airy units as the pinhole.

DNA transfection.

The pcDNA vectors used encoding 4E-BP1 were previously described (85). The pcDNA encoding murine eIF4E was kindly provided by Katherine Borden (Université de Montréal). Vectors encoding p21 were purchased from OriGene. For DNA transfection, HeLa cells were transfected with DNA vectors in a 6-well plate using an Effectene transfection reagent kit (Qiagen). At 48 h later or unless otherwise specified, cells were treated as indicated and then processed for immunofluorescence or collected for Western blot analysis.

Quantitative RT-PCR.

Reverse transcriptase PCRs (RT-PCRs) were performed using a Quantitect reverse transcriptase kit (Qiagen). Each reaction mixture contained 500 ng of RNA (isolated using an RNeasy Plus minikit; Qiagen), 2 μl of 7X genomic DNA wipeout buffer, 4 μl of 5X Quantiscript RT buffer, 1 μl of RT primer mix, and 1 μl of Quantiscript reverse transcriptase. Real-time PCRs were prepared using Platinum Power SYBR green quantitative PCR (qPCR) Master Mix (Life Technologies, CA) and the following ingredients 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. Reactions were run, and data then analyzed using a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with a 4-stage program: stage 1, 20 s at 50°C; stage 2, 10 min at 95°C; stage 3, 40 cycles of a 2-step reaction (95°C for 15 s and 58°C for 60 s); and stage 4, a 3-step reaction (95°C for 15 s, 60°C for 1

min, and 60°C for 15 s). To prepare templates for p21 mRNA, the oligonucleotide pair used was 5'-GACTTTGTCACCGAGACACC-3' (forward) and 5'-GACAGGTCCACATGGTCTTC-3' (reverse). For glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA templates, the oligonucleotide pair used was 5'-ACGACCACTTTGTCAAGCTC-3' (forward) and 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' (reverse). For 4E-BP2 mRNA templates, we used the following oligonucleotide pair: 5'-CCTTACAGCTTGGTGCAGTT-3' (forward) and 5'-ATGAGGCATGACACAAAGGT-3' (reverse).

Preparation of cellular extracts.

Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared as described previously (86). The cells were cooled on ice for 5 min, centrifuged at 150 X g for 5 min, and resuspended in ice-cold EBKL buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 2 mM dithiothreitol (DTT), protease inhibitors, and 0.1% NP-40. The cells were then lysed on ice by 20 strokes in a Dounce homogenizer (Sigma) (tight pestle). The nuclei were removed by two 3-min centrifugations at 600 X g. The resulting supernatant, spun at 10,000 X g for 10 min, was labeled as the total cytoplasmic extract.

Polysome preparation.

Polysomes were prepared as follows. Cells were collected in lysis buffer (20mMTris-HCl [pH 7.4], 1.25mM MgCl₂, 150mMNaCl, 1mMDTT, 1% NP-40, 5 U/ml of RNase inhibitor [Invitrogen]) supplemented with complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche). The cell homogenate was then clarified by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. The cytoplasmic extract was then loaded onto a 15% to 55% linear sucrose gradient previously generated with an Isco model 160 gradient former (Teledyne Isco, Lincoln, NE) and then separated by sedimentation velocity through centrifugation for 2.5 h at

37,000 rpm using a Sorvall TH-641 ultracentrifuge rotor (Du Pont) at 4°C. The sucrose gradient was processed for fractionation using an Isco type 11 optical unit with 254-nm and 280-nm filters (Teledyne Isco). Equal fractions were collected with continuous monitoring of absorbance at 254-nm using an Isco UA-6 UV-visible light (UV-vis) detector (Teledyne Isco). Fractions were precipitated, resuspended in equal volumes of SDS-PAGE sample buffer, and analyzed by Western blotting.

Cap-binding assays.

Cells were lysed in buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and protease inhibitors [Roche] supplemented with 0.5% NP-40), and cell lysates were incubated for 2 h at 4°C with 30 µl of the mRNA cap analog m7GTP-Sepharose (GE Healthcare) in buffer A. The m7GTP-Sepharose-bound proteins were washed with buffer A, and eIF4E-bound proteins were eluted with SDS loading buffer and resolved by SDS-PAGE and Western blotting.

AnnexinV-FITC/PI assay and FACS analysis.

At the end of the experimental period, both adherent and detached cells were harvested. Cells were washed with ice-cold PBS, pelleted again at 1,500 rpm for 10 min at 4°C, and resuspended in ice-cold binding buffer (10 mM HEPES/NaOH [pH 7.4], 140mMNaCl, 2.5mM CaCl₂). Cells were subsequently stained with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) for 15 min in the dark. A total of 2X10⁴ cells were counted and dead cells were examined by flow cytometry. For fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, collected cells were fixed with ethanol, washed with PBS, stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1µg/ml), and analyzed by flow cytometry.

CAM tumor assay.

Day 0 fertilized chicken eggs were purchased from Couvoir Provincial (Victoriaville, QC, Canada). The eggs were incubated for 10 days in a Pro-FI egg incubator fitted with an automatic egg turner before being transferred to a Roll-X static incubator for the rest of the incubation time. The eggs were kept at 37°C in

a 60%-relative-humidity atmosphere for the whole incubation period. Using a hobby drill (Dremel, Racine, WI), a hole was drilled on the side of the embryo, and negative pressure was applied to create a new air sac. A window was opened on this new air sac and was covered with transparent adhesive tape to prevent contamination. A freshly prepared cell suspension (40 μ l) of HeLa cells (1X10⁶ cells/egg) was applied directly onto the freshly exposed chorio allantoic membrane (CAM) tissue through the window. On day 11, the tested drugs were injected intravenously (i.v) in a small volume (100 μ l) into embryos for each experiment. The embryos were incubated until day 17, at which time they were euthanized by transfer at 4°C followed by decapitation. Tumors were collected, and the tumor wet weights were recorded.

1.5. Results

Role of eIF4E in SG formation under mild stress conditions.

Since formation of SG occurs under conditions that inhibit cap dependent translation initiation, it was suggested that this inhibition is sufficient to induce SG. Other studies have reported, however, that genetic depletion or chemical inactivation of the cap-binding protein eIF4E does not result in SG formation, thus establishing steps of translation initiation that can be inactivated without inducing SG (53). This result prompted us to investigate if eIF4E plays an active role in SG formation. First, we tested whether 4EGI-1, a compound that inactivates eIF4E by disrupting its interaction with both eIF4GI (54, 55) (see Fig. S1A in the supplemental material) and mRNA (55), alters formation of SG. HeLa cells were treated with 4EGI-1, and SG formation was then assessed upon arsenite (150 μ M) treatment, using immunofluorescence with antibodies specific to the two SG markers FMRP and G3BP1 (56, 57). This mild arsenite

concentration was chosen as the minimal level inducing SG in > 90% of HeLa cells within 1 h. The results show that 4EGI-1 significantly reduced both the number (from 90% in mock-treated cells to \leq 50% in 4EGI-1-treated cells) and the size (from \sim 2 μ m in mock-treated cells to \sim 1 μ m in 4EGI-1-treated cells) of SG upon arsenite treatment (Fig. 1A). Suppressing SG formation in HeLa by 4EGI-1 is not specific to arsenite, since we obtained similar results upon treatment with Bortezomib (2 μ M), a mild stressor (data not shown). SG formation that occurs upon either arsenite or Bortezomib treatment is known to require phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α (5, 6, 58–61), a key event known to inhibit translation initiation under stress situations (62). However, 4EGI-1 did not prevent the phosphorylation of eIF2 α induced by either arsenite (Fig. 1B) or Bortezomib (data not shown), even though it altered SG formation (Fig. 1A). The latter results exclude the possibility that 4EGI-1 inhibits SG formation under mild stress conditions by altering eIF2 α phosphorylation and suggest that eIF4E is required for formation of SG, which is inhibited by 4EGI-1. To further confirm that eIF4E is required for SG formation, we knocked down its expression in HeLa cells with two different eIF4E-targeted siRNAs and assessed SG formation upon arsenite addition (150 μ M) using immunofluorescence with antibodies specific to the three SG markers FMRP, G3BP1, and FXR1 as well as to eIF4E.

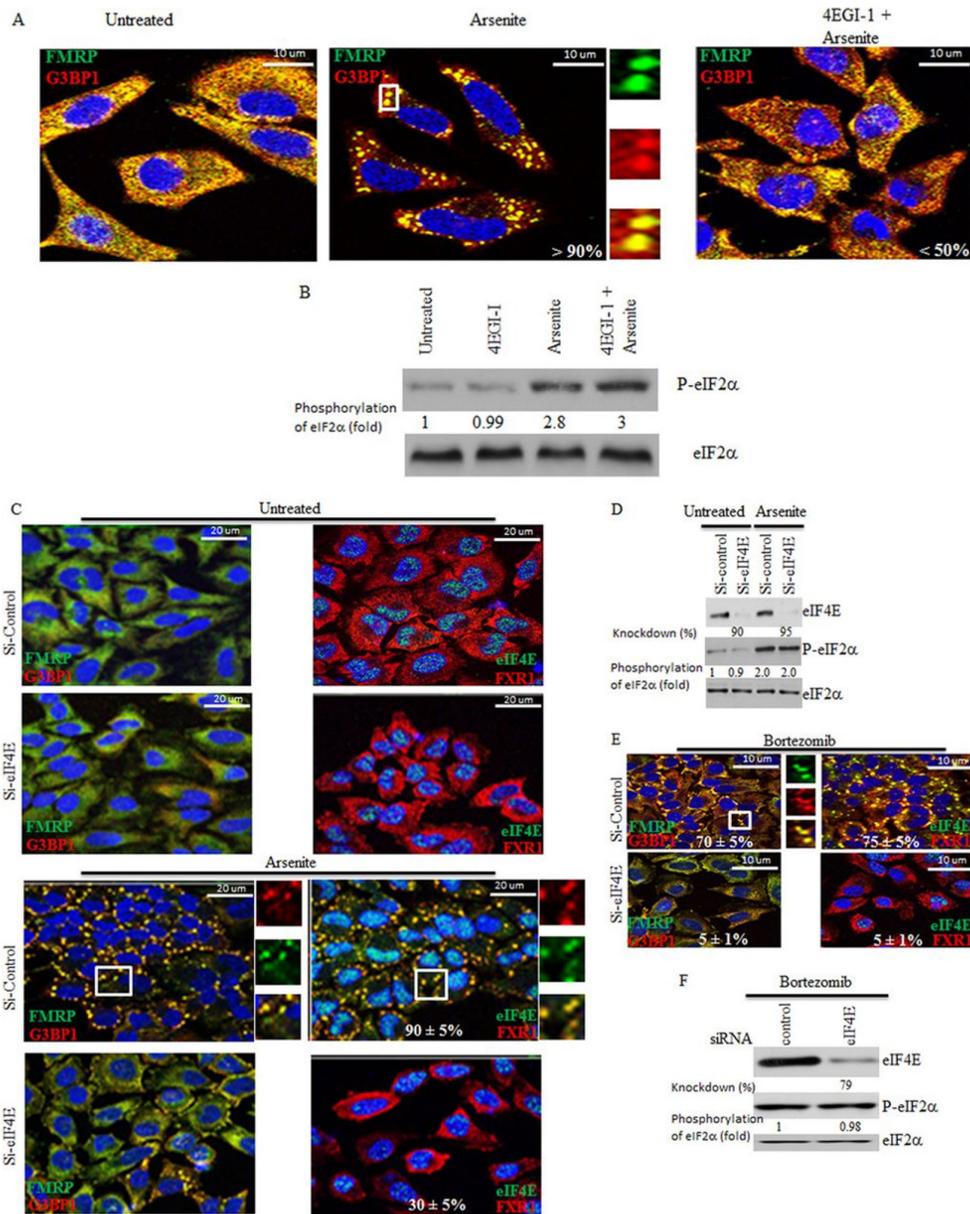


FIG 1. Inactivating eIF4E or reducing its levels in HeLa cells impairs SG formation without affecting phosphorylation of eIF2 α .

(A and B) Cells were pre-incubated with 4EGI-1 (250 μ M) for 6 h and then treated with 150 μ M arsenite in the presence of 4EGI-1 (250 μ M) for one additional hour. (A) Cells were then fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence using antibodies against different SG markers (FMRP in green and G3BP1 in red). DAPI (blue) was used as a nuclear stain. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (>3 granules/cell) from at least 5 different fields and 5 different experiments containing a total of 2X10³ cells is indicated at the bottom of the merged images. Typical SG are shown in enlarged pictures. (B) Cells were then lysed, and total cell lysates were analyzed by Western blotting for eIF2 α phosphorylation using anti-phospho-eIF2 α antibodies. Total eIF2 α was analyzed using pan-eIF2 α antibodies. The amount of phosphorylated eIF2 α was determined by densitometry quantitation of the film signal and is expressed as a percentage of total eIF2 α . The results are representative of 3 different experiments. (C to F) Cells were treated with nonspecific or eIF4E-selective siRNAs for 96 h. Cells were then incubated with 150 μ M arsenite for 1 h (C and D) or with 2 μ M Bortezomib for 4 h (E and F). (C and E) Cells were fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP (green), anti-G3BP1 (red), and anti-FXR1 (red) antibodies. Anti-eIF4E (green) antibodies were used in order to detect SG and to assess eIF4E depletion. DAPI (blue) was used as a nuclear stain. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (>3 granules/cell) from 5 different fields and 5 different experiments for a total of 2 X 10³ cells is indicated in the merged images. Typical SG are shown. (D and F) Cells were lysed, and protein extracts were prepared and analyzed by Western blotting to detect eIF4E and phospho-eIF2 α . Total eIF2 α was analyzed using the pan-eIF2 α antibodies and served as a loading control. The percentage of eIF4E knockdown was determined by densitometry quantification of the film signal using Photoshop and expressed as a percentage of total eIF2 α . The amount of phosphorylated eIF2 α was determined as described for panels A and B. The results are representative of 3 different experiments.

We found that depletion of eIF4E (Fig. 1C and D) significantly reduced both the number (from 90% in mock-depleted cells to ~30% in eIF4E-depleted cells) and the size (from ~2 μm to $\leq 1 \mu\text{m}$) of SG upon arsenite treatment (Fig. 1C), thus corroborating the results obtained with 4EGI-1 (Fig. 1A). This negative effect of eIF4E depletion is specific, since formation of SG was rescued in eIF4E-depleted cells by expressing murine eIF4E insensitive to eIF4E siRNAs used to deplete human eIF4E (see Fig. S1B and C in the supplemental material). Depletion of eIF4E or its inactivation by 4EGI-1 in both MCF-7 and Hs578T human breast carcinoma cells also significantly diminished formation of SG (see Fig. S1D to F in the supplemental material; also data not shown), indicating that the role of eIF4E in SG assembly is not limited to HeLa cells. Furthermore, the antagonistic effect of eIF4E depletion on SG formation is not specific to arsenite since we obtained similar results upon treatment with Bortezomib. In this case, depletion of eIF4E with siRNAs decreased the proportion of SG-containing cells to $\leq 5\%$ compared to 75% in mock-depleted HeLa cells (Fig. 1E). Depletion of eIF4E in HeLa cells does not affect the phosphorylation of eIF2 α induced by either arsenite or Bortezomib (Fig. 1D and F), excluding the possibility that depletion of eIF4E inhibits SG formation by altering eIF2 α phosphorylation. Overall, these results unveil a novel requirement of eIF4E in SG formation under our mild stress conditions.

Inactivation of the mTORC1-eIF4E regulatory pathway impairs SG formation.

The mTORC1 signaling cascade is the main pathway known to regulate eIF4E-mediated cap-dependent translation in response to mitogens. The results described above clearly suggested a positive role of eIF4E in SG formation. We thus rationalized that mTORC1 might be involved in SG formation through the stimulation of eIF4E activity. To test this hypothesis, we first depleted mTOR using two specific siRNAs and then assessed SG formation in mTOR-depleted cells upon either arsenite (150 μ M) or Bortezomib (2 μ M) treatment. We found that depletion on mTOR in HeLa cells significantly inhibited SG formation (from 90% in mock-depleted cells to \leq 40% in mTOR-depleted cells) (Fig. 2A; see also Fig. S2 in the supplemental material), and we obtained similar results using both MCF-7 cells and Hs578T cells (data not shown), thereby unveiling a novel role of mTOR in formation of SG. Depletion of mTOR was assessed by both Western blot and immunofluorescence analysis using anti-mTOR antibodies (Fig. 2B; see also Fig. S2 in the supplemental material). A recent report described a localization of mTOR in SG upon arsenite (500 μ M) treatment (63). However, we did not observe significant colocalization of mTOR with FMRP in the majority of SG induced by either arsenite (150 μ M) or Bortezomib (2 μ M), indicating that mTOR was not quantitatively recruited to SG under our stress conditions (see Fig. S2 in the supplemental material). These results indicate that the role of mTOR in SG formation is unlikely to be related to its localization in SG. Control Western blot analysis (Fig. 2B) shows that mTOR depletion (panel a) did not affect either arsenite- or Bortezomib-induced eIF2 α phosphorylation (panels b and c). As expected, mTOR depletion reduced the phosphorylation of 4E-BP1, thus resulting in the accumulation of hypophosphorylated 4E-BP1 (panels d and e), a binding inhibitor of eIF4E. These results suggest a novel role of mTOR in SG formation via the phosphorylation of its 4E-BP1 target. Phosphorylation of 4E-BP1 is

mediated specifically by mTORC1. 4E-BP1 is recruited to mTORC1 through Raptor, a specific component of mTORC1 (27, 28). If mTORC1 is required for formation of SG through phosphorylation of 4E-BP1, then altering mTORC1-mediated phosphorylation of 4E-BP1 through Raptor depletion should diminish formation of SG. We found that depletion of Raptor in HeLa cells using two specific siRNAs significantly inhibited SG formation under Bortezomib treatment conditions (from 70% in mock depleted cells to $\leq 20\%$ in Raptor-depleted cells) (Fig. 2C). Under these conditions, depletion of rictor, the mTORC2-defining component, had no effect on formation of SG (data not shown). Depletion of Raptor reduced phosphorylation of 4E-BP1 (Fig. 2D) in concordance with previous studies (64). Together, these results suggest that mTORC1 is required for formation of SG through phosphorylation of 4E-BP1. Several drug inhibitors have been developed that target mTOR. The well-known inhibitor rapamycin reduces mTORC1 activity but is ineffective at preventing SG formation upon arsenite treatment (data not shown), as previously reported (65). A newer mTOR inhibitor, pp242, is more effective in suppressing mTORC1-mediated phosphorylation of 4E-BP1 than rapamycin (48, 51). We thus used pp242 to further assess the role of mTOR in the induction of SG formation. We found that treatment of HeLa cells with pp242 significantly inhibits both the number (from 90% in mock-treated cells to less than 30% in pp242-treated cells) and the size (from $\sim 2 \mu\text{m}$ to $\leq 0.5 \mu\text{m}$) of SG upon treatment with arsenite ($150 \mu\text{M}$). There was a nearly complete abrogation of formation of SG by pp242 (from 70% in mock-treated cells to $\sim 2\%$ in pp242-treated cells) upon treatment with Bortezomib ($2 \mu\text{M}$) (Fig. 2E). It was previously shown that prolonged (48 h) treatment of mouse embryonic fibroblasts with the mTORC1 inhibitor pp242 induced their accumulation at the G1 phase (66).

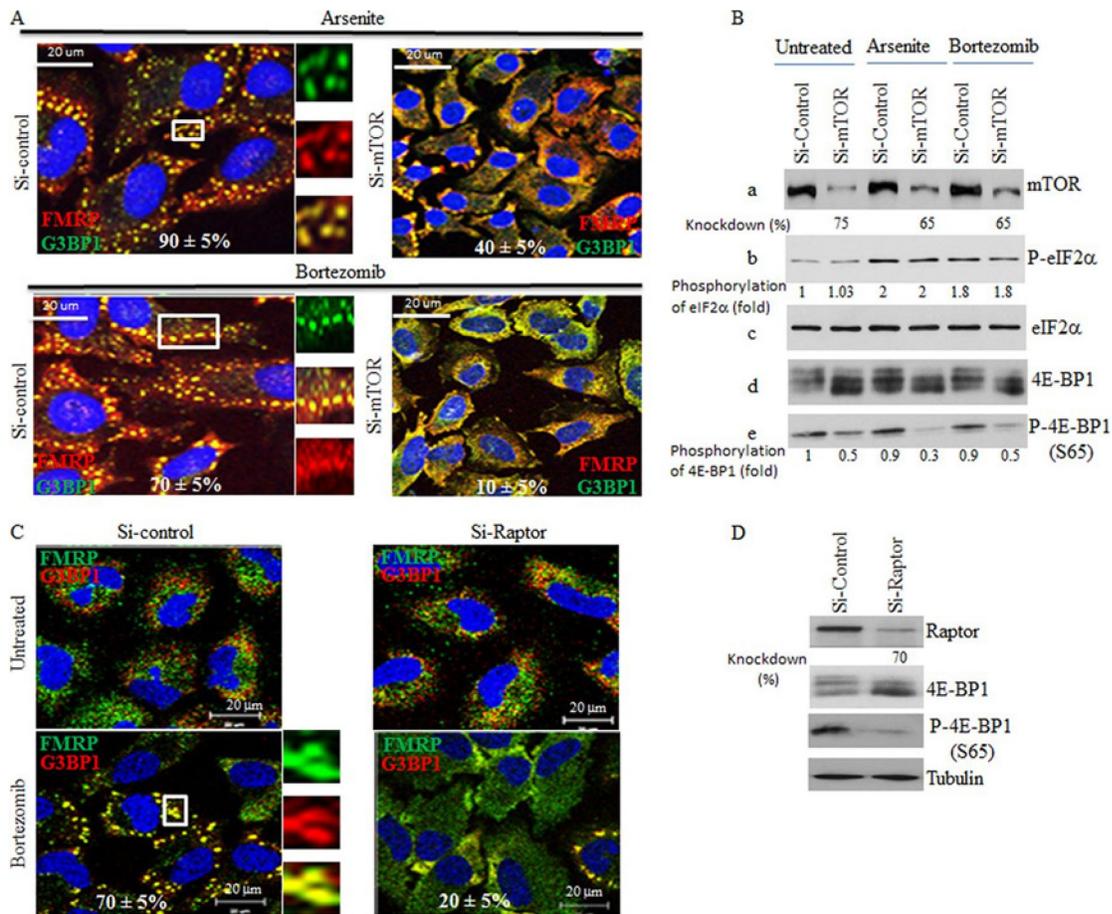


FIG 2. Depletion of either mTOR or Raptor as well as chemical inactivation of mTOR alters SG formation in HeLa cells without affecting eIF2 α phosphorylation.

(A and B) Cells were treated with nonspecific or mTOR-selective siRNAs for 96 h and then were incubated with either 150 μ M arsenite for 1 h or with 2 μ M Bortezomib for 4 h. (A) Cells were fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1. The percentage of cells harboring SG (>3 granules/cell) from 5 different fields and 5 different experiments containing a total of 2 X 10³ cells is indicated at the bottom of the merged images. Representative SG are shown in enlarged pictures. (B) Cells were lysed, and protein extracts were prepared and analyzed by Western blotting to detect mTOR, phospho-eIF2 α , 4E-BP1, and phospho-4E-BP1 (S65) using the appropriate antibodies. Total eIF2 α serves as a loading control.

The percentage of mTOR knockdown and the amount of phosphorylated eIF2 α and phospho-4E-BP1 were determined as described above. The results are representative of 5 different experiments. (C and D) Depletion of Raptor inhibits formation of SG. Cells were treated with nonspecific or Raptor-selective siRNAs and were then incubated with 2 μ M Bortezomib for 4 h. (C) Cells were fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1, as described above. The percentage of cells harboring SG from 5 different fields and 3 different experiments containing a total of 103 cells is indicated at the bottom of the merged images. (D) Cells were lysed, and protein extracts were prepared and analyzed by Western blotting to detect Raptor, 4E-BP1, phospho-4E-BP1 (S65), and tubulin (loading control) using the appropriate antibodies. The percentage of Raptor knockdown was determined as described above. The results are representative of 3 different experiments.

Our FACS analysis shows, however, that short (7h) treatment of HeLa cells with pp242 had no effect on the cell cycle (Fig. 2F), although it abrogated formation of SG. These results exclude the possibility that the negative effect of pp242 on formation of SG upon treatment of HeLa with either arsenite or Bortezomib is due to a cell cycle defect. The (~70% to 90%) inhibition of SG formation by pp242 was even more drastic in MCF-7 cells (see Fig. S3A in the supplemental material) as well as in Hs578T and N2a mouse neuroblastoma cells (data not shown). Likewise, torin 1 inhibited the mTORC1-dependent phosphorylation of 4E-BP1 (49, 52). As expected, incubation of MCF-7 with torin 1 significantly (~70%) reduced SG formation upon treatment with arsenite (250 μ M) (data not shown). Torin 1 also reduces both the number and the size of SG induced by Bortezomib and arsenite, respectively (see Fig. S3C; also data not shown) in HeLa cells, albeit less efficiently than pp242. These results indicate that pharmacological inhibition of mTORC1 activity impairs SG formation in various cancer cell lines, as expected from the results obtained with siRNA-induced mTOR and Raptor depletions (Fig. 2A and C). We obtained similar results using mild heat shock (43°C) as a SG inducer (data not shown), further supporting the idea of a general role of mTORC1 in formation of SG. Moreover, control experiments showed that neither arsenite nor Bortezomib had any significant effect on 4E-BP1 phosphorylation (Fig. 2G; see Fig. S3 and S4 in the supplemental material; also data not shown), indicating that under our experimental conditions, these compounds did not inhibit mTORC1-mediated 4E-BP1 phosphorylation. This is consistent with previous results showing that arsenite does not inhibit mTORC1 signaling (67, 68), which might thus promote SG formation, as described above (Fig. 2). As expected, both arsenite and Bortezomib induced phosphorylation of eIF2 α (Fig. 2B and G; see Fig. S4B), and both treatments induced polysome disassembly in either the absence or presence of pp242 in both HeLa and MCF-7 cells (see Fig. S4A; also data not shown), indicating that translation initiation was disrupted. Thus, although translation initiation was inhibited by either arsenite or Bortezomib, mTORC1 remained active under those stress conditions (Fig. 2B and G; see also Fig. S3B and D and S4B) and its inhibition by pp242 (Fig. 2G; see

also Fig. S3B) impaired SG formation (Fig. 2E; see also Fig. S2 and S3 in the supplemental material). Neither arsenite- nor Bortezomib- induced phosphorylation of eIF2 α (Fig. 2G; see also Fig. S4B in the supplemental material) was affected by pp242, ruling out the possibility that mTORC1 inhibition by pp242 suppresses formation of SG by altering the phosphorylation of eIF2 α . Moreover, and consistent with previous data (50, 52, 69), mTORC1 inhibition reduced translation initiation; albeit minimally, as evidenced by the slight decrease in polysome peak sizes in pp242-treated HeLa cells (see Fig. S4A) and MCF-7 cells (data not shown). These results exclude the possibility that mTORC1 inhibition by pp242 altered SG formation by completely blocking general translation. Although pp242 (see Fig. S4A) did not dramatically affect general translation initiation, it induced a marked hypophosphorylation of 4E-BP1 in all cell lines tested, independently of the presence of either arsenite or Bortezomib (Fig. 2G; see Fig. S3 and S4; also data not shown). These results suggest that mTOR inactivation impairs SG formation through a specific mechanism which likely involves 4E-BP1 hypophosphorylation.

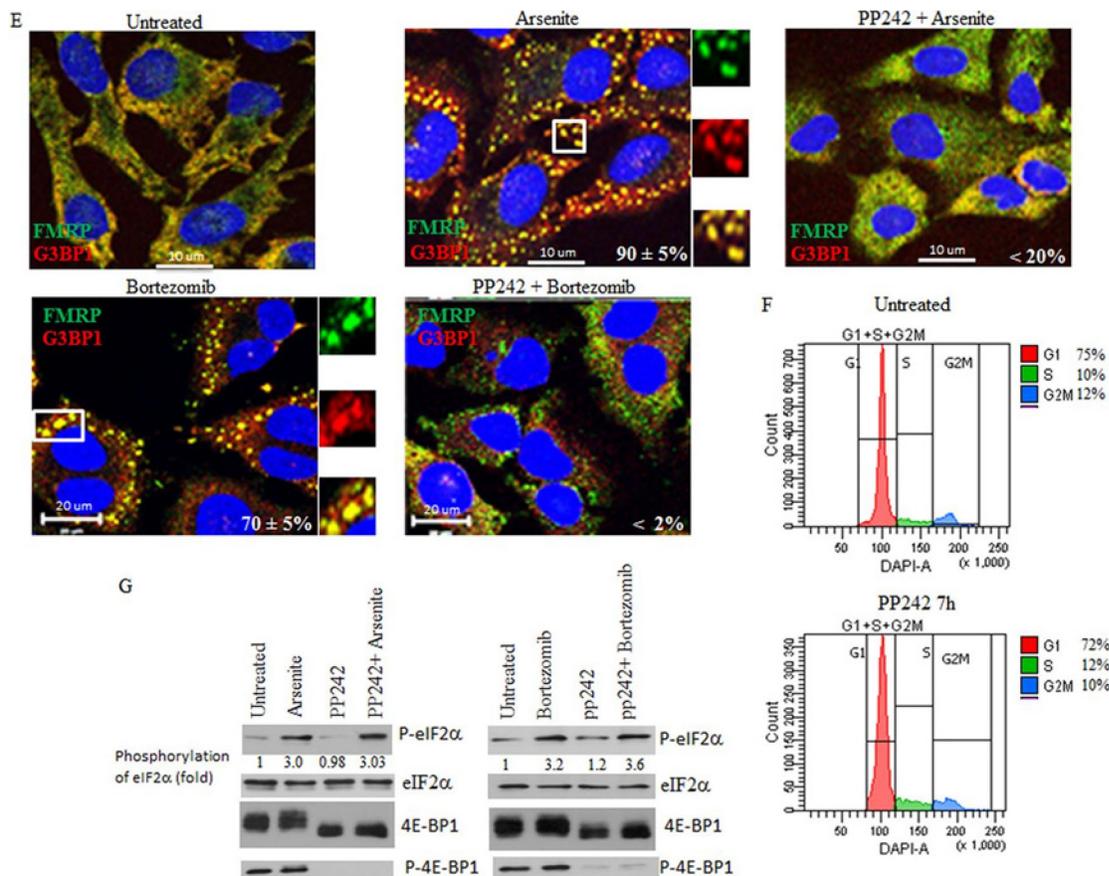


FIG 2. Depletion of either mTOR or Raptor as well as chemical inactivation of mTOR alters SG formation in HeLa cells without affecting eIF2 α phosphorylation.

(E) The mTOR inhibitor pp242 is a novel SG suppressor drug. Cells were either pretreated with pp242 (2.5 μ M) for 6 h and then incubated with 150 μ M arsenite plus 2.5 μ M pp242 for 1 h (PP242 + Arsenite) or pretreated with pp242 (2.5 μ M) for 4 h and then incubated with 2 μ M Bortezomib for 4 h (PP242 + Bortezomib). As controls, cells were treated with pp242 (2.5 μ M) for 7 h (PP242), with 150 μ M arsenite for 1 h (Arsenite), or with 2 μ M Bortezomib for 4 h (Bortezomib). Cells were then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP (green) and anti-G3BP1 (red) antibodies. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (>3 granules/cell) from 5 different fields and 5 different experiments containing a

total of 2×10^3 cells is indicated at the bottom of merged images. Typical SG are shown in enlarged pictures. (F) Cells were left untreated or were treated with 2.5 μM pp242 for 7 h, collected, washed with PBS, and then fixed with ethanol for 20 min. Cells were washed with PBS, stained with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and analyzed by flow cytometry. (G) Cells were either pretreated with pp242 (2.5 μM) for 6 h and then incubated with 150 μM arsenite plus 2.5 μM pp242 for 1 h (PP242 + Arsenite) or were pretreated with pp242 (2.5 μM) for 4 h and then incubated with 2 μM Bortezomib for 4 h (PP242 + Bortezomib). As controls, cells were treated with pp242 (2.5 μM) for 7 h (PP242), with 150 μM arsenite for 1 h (Arsenite), or with 2 μM Bortezomib for 4 h (Bortezomib). Cells were lysed, and protein extracts were prepared and analyzed by Western blotting to detect phospho-eIF2 α , 4E-BP1, and phospho-4E-BP1 (S65) using the appropriate antibodies. Total eIF2 α was analyzed using the pan-eIF2 α antibodies and serves as a loading control. The amount of phosphorylated eIF2 α was determined as described above. The results are representative of 5 different experiments.

PP242-induced hypophosphorylation of 4E-BP1 prevents eIF4E-mediated SG formation.

In the absence of mTOR activity, binding of hypophosphorylated 4E-BP1 to eIF4E prevents its association with eIF4GI, thus impairing formation of translation initiation complexes competent for mTORC1-dependent translation initiation. Thus, one possible mechanism by which mTOR inactivation impairs SG formation involves the disruption of eIF4E-eIF4GI associations by 4E-BP1. To test this possibility, we first assessed the role of 4E-BP1 in pp242-mediated SG suppression in HeLa cells. We depleted 4E-BP1 using two different siRNAs and assessed both arsenite- and Bortezomib-induced SG formation upon mTOR inactivation with pp242 (Fig. 3; see also Fig. S5A in the supplemental material). Control experiments showed that 4E-BP1 depletion per se (Fig. 3A; see also Fig. S5A) does not prevent SG formation upon either arsenite treatment (Fig. 3B) or Bortezomib treatment (see Fig. S5A), excluding a possible positive role of this protein in SG formation under our experimental conditions. This notion is supported by localization studies showing that 4E-BP1 is excluded from SG (see Fig. S5A), confirming a previous report (65). As expected, pp242-mediated mTOR inactivation reduced SG formation in mock-depleted cells (Fig. 3B; see also Fig. S5A). However, this negative effect of mTOR inhibition on arsenite-induced SG formation was significantly rescued by 4E-BP1 depletion (~60% of pp242-treated cells contained SG) compared to mock-depleted cell results (~10% of pp242-treated cells formed SG) (Fig. 3B). We obtained similar results upon Bortezomib treatment (see Fig. S5A). 4E-BP1 has two homologs, 4E-BP2 and 4E-BP3 (70–72). In addition to 4E-BP1, HeLa cells express 4E-BP2, but they lack detectable 4E-BP3 (72). We found that depletion of 4E-BP2 (see Fig. S5D) does not rescue formation of arsenite-induced SG upon pp242 treatment (see Fig. S5C). Although we do not exclude the possibility of a minimal contribution of 4E-BP2, our results indicate that pp242-induced suppression of SG involves 4E-BP1 hypophosphorylation as a result of mTORC1 inhibition.

Using cap-binding assays, we then investigated the possibility that hypophosphorylated 4E-BP1 suppresses SG formation by sequestering eIF4E, thus preventing its interaction with eIF4GI. HeLa cell lysates were incubated with the cap analogue m7GTP bound to Sepharose beads. The cap-binding protein eIF4E along with its bound partners was eluted and analyzed by Western blotting. Control experiments revealed a barely detectable interaction between eIF4E and 4E-BP1 in lysates prepared from either untreated or arsenite-treated cells (Fig. 3C, right, panels a to c).

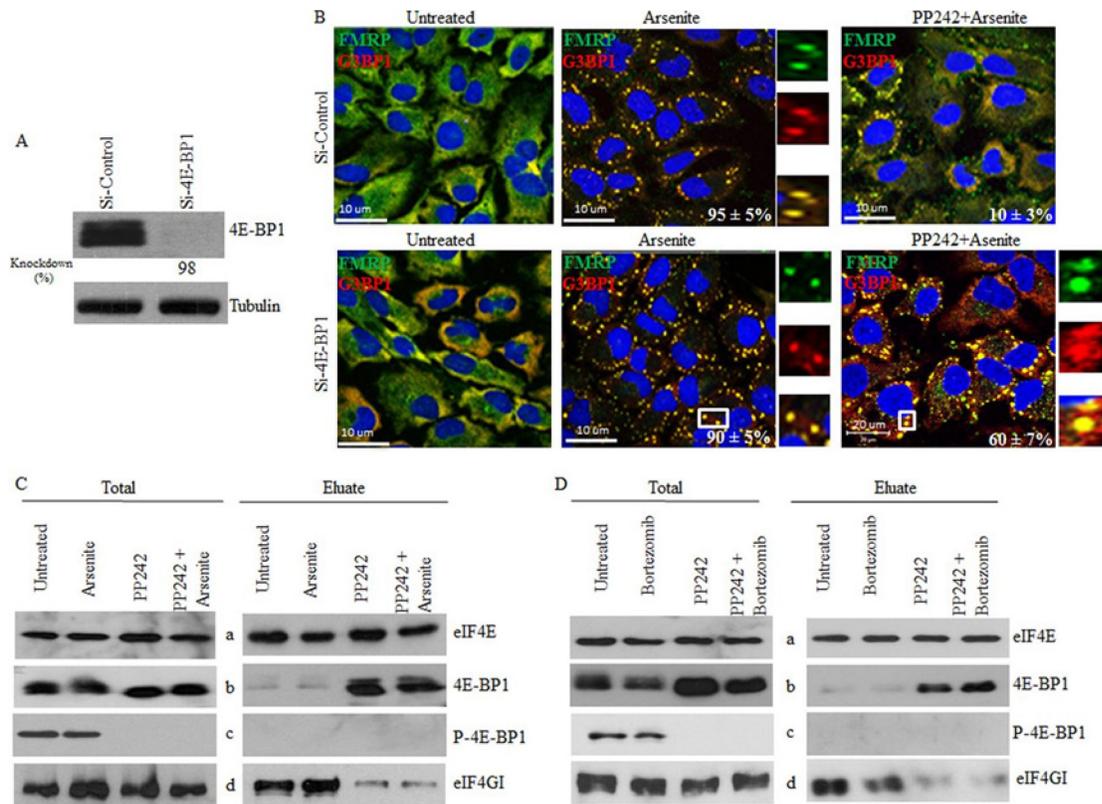


FIG 3. mTOR inactivation-induced hypophosphorylation of 4E-BP1 prevents eIF4E-mediated SG formation by disrupting its interaction with eIF4GI.

(A and B) Depletion of 4E-BP1 rescues arsenite-induced SG formation in pp242-treated cells. HeLa cells were treated with nonspecific or 4E-BP1-selective siRNAs for 96 h. (A) Cells were lysed, and protein extracts were prepared and analyzed by Western blotting to detect 4E-BP1 using specific antibodies. Tubulin serves as a loading control. (B) Cells were then left untreated or were treated with pp242 (2.5 μ M) for 7 h or arsenite (150 μ M) for 1 h or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 6 h before addition of arsenite (150 μ M) together with pp242 (2.5 μ M) for an additional 1 h. Cells were then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies. Pictures were taken using a 63 X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (>3 granules/cell) from 5 different fields and 5 different experiments containing a total of 2 X 10³ cells is indicated at the bottom of merged images. (C) pp242

disrupts eIF4F assembly, as monitored by cap-binding assays. HeLa cells were left untreated or were treated with pp242 (2.5 μ M) for 7 h or arsenite (150 μ M) for 1 h or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 6 h before addition of arsenite (150 μ M together with pp242 (2.5 μ M) for an additional 1 h. Cells were lysed and then incubated with m7GTP-Sepharose beads. Eluted proteins were analyzed by Western blotting using specific antibodies. Total is 1% of the input used for cap pulldown. (D) HeLa cells were left untreated or were treated with pp242 (2.5 μ M) for 8 h or Bortezomib (2 μ M) for 4 h or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 4 h before addition of Bortezomib (2 μ M) for an additional 4 h. Cells were lysed and then incubated with m7GTP-Sepharose beads. Eluted proteins were analyzed by Western blotting using specific antibodies. Total is 1% of the input used for cap pulldown.

Alone or in combination with arsenite, pp242 induced a strong interaction between hypophosphorylated 4E-BP1 and eIF4E (Fig. 3C, right, panels a and b). As expected, no interaction between phosphorylated 4E-BP1 and eIF4E was detected in these assays under any of the conditions tested (Fig. 3C, right, panels a and c). We obtained similar results in cells treated with pp242 together with Bortezomib (Fig. 3D) and in MCF-7 cells (data not shown). Thus, mTORC1 inactivation by pp242 likely contributes to SG suppression by inducing the interaction of eIF4E with its hypophosphorylated 4E-BP1 inhibitory factor. Alone or in combination either with arsenite (Fig. 3C, right, panels a and d) or with Bortezomib (Fig. 3D, right, panels a and d), pp242 strongly decreased the amount of eIF4GI, a molecular mimic of 4E-BP1, bound to eIF4E. These results support the assumption that 4EBP1 antagonizes SG formation by competing against eIF4E-eIF4GI interactions. Moreover, the negative effect of pp242 on eIF4E-4GI interactions was rescued in 4E-BP1-depleted cells (see Fig. S5B in the supplemental material), in keeping with previous data obtained using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking 4E-BPs (66). The latter result is consistent with the above-described rescue data (Fig. 3B; see also Fig. S5A), showing the formation of SG in 4E-BP1-depleted cells despite mTOR inhibition with pp242. As a control, depletion of 4E-BP2 does not rescue eIF4E-4GI interactions in pp242-treated cells (see Fig. S5E), in keeping with a recent study showing a dispensable role of 4E-BP2 in disrupting eIF4E-4GI association in torin 1-treated cells (52). This lack of effect of 4E-BP2 depletion on eIF4E-4GI association is also consistent with our results showing a dispensable role of 4EBP2 in mediating the pp242-negative effects on formation of SG (see Fig. S5C). Overall, these results suggest that targeting mTORC1-induced eIF4E-eIF4GI association by the pp242-mediated hypophosphorylation of 4E-BP1 impairs SG formation.

4E-BP1 antagonizes SG formation when it is hypophosphorylated. The results described above suggest that 4E-BP1 plays an antagonistic role in SG formation by disrupting eIF4E-4GI interactions. Therefore, expressing a dominant-negative and constitutively hypophosphorylated 4E-BP1-4A mutant, as well as RNA interference (RNAi)-mediated depletion of eIF4GI, should disrupt eIF4E

complexes, thus suppressing SG formation. Using cap binding assays, we first analyzed eIF4E-eIF4GI interactions in cells overexpressing the constitutively hypophosphorylated 4EBP1-4A mutant. Control experiments (see lane 1 in Fig. S5F in the supplemental material) showed, as expected, a strong interaction between eIF4E and eIF4GI in mock-transfected cells. While a strong interaction between 4E-BP1-4A and eIF4E was found, eIF4GI was barely recovered in these 4E-BP1-4A-eIF4E complexes (see lane 2 in Fig. S5F), indicating that the eIF4E-eIF4GI interaction is lost in cells expressing the hypophosphorylated 4EBP1-4A mutant form. We also detected an interaction between wild-type (wt) 4E-BP1 and eIF4E, albeit it was less strong than the 4E-BP1-4A-eIF4E interaction (see lane 3 in Fig. S5F). However, this apparent weaker interaction between wt 4E-BP1 and eIF4E appears to be sufficient to disrupt the eIF4E-eIF4GI interaction, as evidenced by the reduced recovery of eIF4GI in eIF4E complexes (see lane 3 in Fig. S5F). Control experiments showed that expression of an 4E-BP1 mutant (4E-BP1- Δ 4E) which is unable to interact with eIF4E had no effect on eIF4E-eIF4GI association in our assays (see lane 4 in Fig. S5F). Overall, these results show that expression of either wt 4E-BP1 or its hypophosphorylated 4EBP1-4A mutant disrupts eIF4E-eIF4GI interaction. Expression of either wt 4E-BP1 or its hypophosphorylated 4E-BP1-4A mutant significantly (~50% to 55% or 75% to 80%, respectively) prevented SG formation upon arsenite treatment (Fig. 4A and B), as well as under conditions of Bortezomib treatment (data not shown), compared to mock-transfected cell results. As expected, expression of 4E-BP1- Δ 4E has much less (~10%) effect on SG formation. These results indicate that 4E-BP1 inhibits SG formation mainly through its hypophosphorylated form, which disrupts formation of mTORC1-dependent translation initiation complexes by binding eIF4E, thereby preventing its association with eIF4GI. Our immunofluorescence (Fig. 4A; see also Fig. S5A in the supplemental material) and Western blot (see Fig. S5G) experiments showed that overexpressed 4E-BP1 localizes in both nuclei and cytoplasm, consistent with previous data (65).

Fractionation studies showed, however, that eIF4E is distributed mainly in the cytoplasm where 4E-BP1 is sequestering it (see Fig. S5G). Finally, we assessed whether disruption of eIF4E-eIF4GI through eIF4GI depletion could suppress SG formation. We found that depletion of eIF4GI in both HeLa (Fig. 4C; see also Fig. S6 in the supplemental material) and MCF-7 (data not shown) cells with two specific siRNAs strongly (>70%) inhibits SG formation upon either arsenite or Bortezomib treatment, thus identifying eIF4GI as a novel factor required for SG formation. Depletion of eIF4GI did not affect either the cell cycle (Fig. 4D) or phosphorylation of eIF2 α upon arsenite (Fig. 4E) or Bortezomib (data not shown) treatment, in keeping with the results obtained upon eIF4E depletion (Fig. 1 and 4). These results exclude the possibility that eIF4GI depletion inhibits SG formation by arresting the cell cycle or by altering eIF2 α phosphorylation and support the notion of a positive role of the eIF4E-eIF4GI interaction in SG formation. In conclusion, we have uncovered a novel role for mTORC1-induced eIF4E-eIF4GI interactions in SG formation. Furthermore, 4E-BP1 inhibits mTORC1-dependent SG formation by disrupting eIF4E-4GI association.

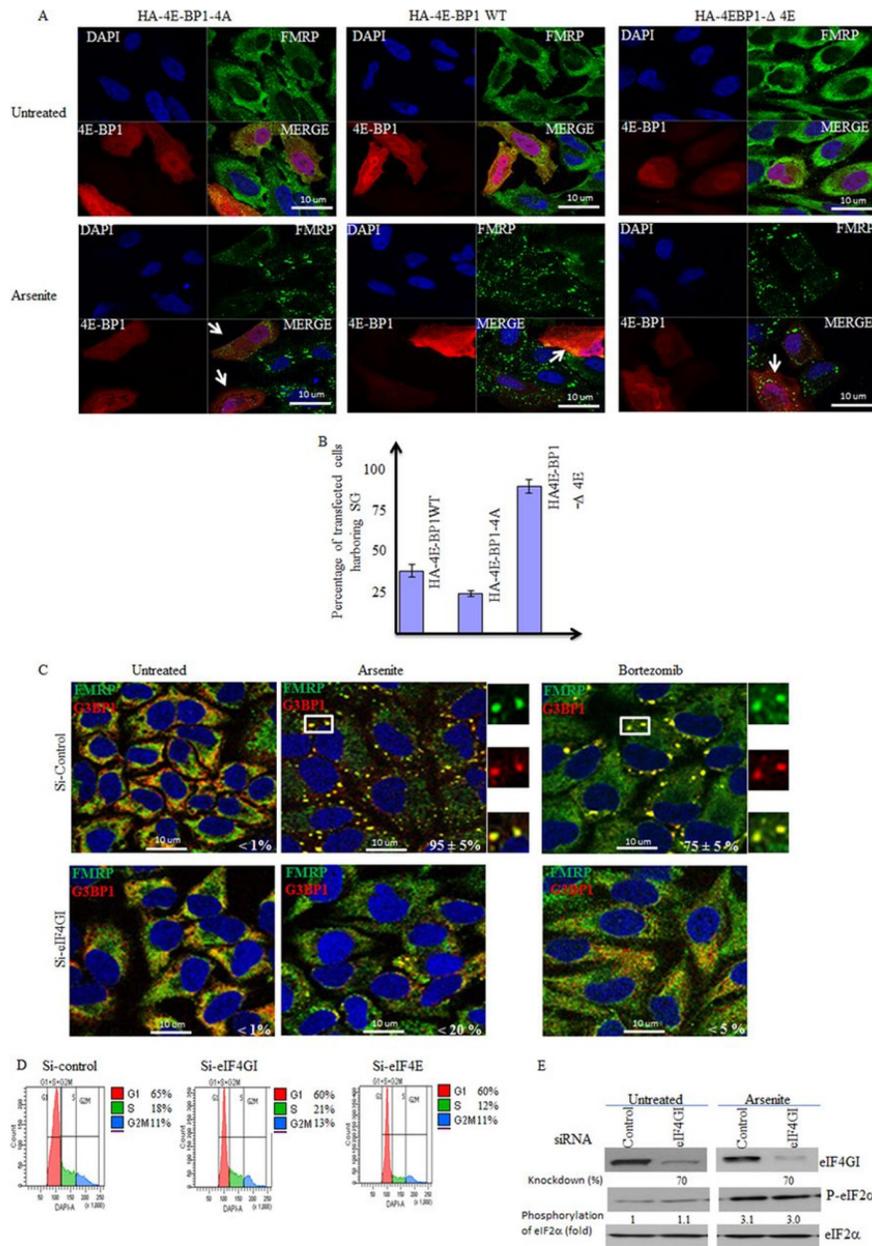


FIG 4. eIF4GI is required for formation of SG, which is antagonized by 4E-BP1.

(A and B) HeLa cells were transfected with wild-type (WT) HA-4E-BP1 or HA-4E-BP1-4A or with HA-4E-BP1- Δ 4E for 48 h and were then treated with arsenite (150 μ M) for 1 h. (A) Cells were processed for immunofluorescence to detect 4E-BP1 with anti-4E-BP1 antibodies or SG using anti-FMRP antibodies. (B) The percentage of transfected cells (indicated by arrows) harboring SG (>3 granules/cell) from 5 different fields and 3 different experiments containing a total of 500 cells is indicated. (C to E) eIF4GI is a novel SG-promoting factor. Cells were treated with nonspecific or eIF4GI-specific siRNAs for 96 h. Cells were treated with 150 μ M arsenite for 1 h or with 2 μ M Bortezomib for 4 h. (C) HeLa cells were fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies. Pictures were taken using a 63 X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG was calculated as described for Fig. 2. (D) Cells were treated with nonspecific or eIF4E- or eIF4GI-specific siRNAs for 96 h. Cells were collected, washed with PBS, and then fixed with ethanol for 20 min. Cells were washed with PBS, stained with DAPI (1 μ g/ml), and analyzed by flow cytometry. (E) Cells were treated with nonspecific or eIF4GI-specific siRNAs for 96 h. Cells were lysed, and protein extracts were prepared and analyzed by Western blotting to detect eIF4GI and phospho-eIF2 α . Total eIF2 α was analyzed using the pan-eIF2 α antibodies and serves as a loading control. The percentage of eIF4GI knockdown and phosphorylated eIF2 α was determined as described above by densitometry quantification of the film signal using Photoshop, and results are expressed as a percentage of total eIF2 α . The results are representative of 3 different experiments.

PP242 sensitizes cancer cells to Bortezomib-mediated apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo. Previous studies have implicated SG in HeLa and MCF-7 cell resistance to Bortezomib-mediated apoptosis (5, 6). This SG-mediated resistance to Bortezomib involves upregulation of the expression of the antiapoptotic factor p21WAF1/CIP1, which, in turn, is due to the accumulation of p21 mRNA within SG (6). Moreover, interfering with p21 expression, either by siRNA-mediated p21 mRNA depletion or by inducing p21 mRNA degradation by blocking its recruitment within SG, promoted apoptosis during Bortezomib treatment (6). Based on the evidence described above and since SG inhibit apoptosis (73), we hypothesized that impairing SG formation either through mTORC1 inactivation with pp242 or by depleting eIF4E and eIF4GI sensitizes cancer cells to Bortezomib induced apoptosis. First, we assessed whether the inhibition of SG formation by pp242 or through depletion of eIF4E and eIF4GI might prevent SG-associated p21 upregulation following Bortezomib treatment. p21 mRNA and its protein product have a short half-life and are thus barely detectable under normal growth conditions, as confirmed in control experiments (Fig. 5A, B, and D). Neither the level of p21mRNA nor its expression in HeLa cells (Fig. 5A and B) or in MCF-7 cells (see Fig. S7A and B in the supplemental material) was affected by pp242, indicating that p21 mRNA is unlikely to be a direct target of mTOR signaling. In agreement with previous data (6), Bortezomib induced an upregulation of p21 expression in both HeLa and MCF-7 cells at both the protein level (Fig. 5A and D; see also Fig. S7A) and the mRNA level (Fig. 5B and E; see also Fig. S7B). Since p21 mRNA accumulation induced by Bortezomib is related to its stabilization within SG (6), we reasoned that disrupting SG formation with pp242 or by depleting eIF4E or eIF4GI or mTOR should prevent p21 mRNA accumulation, thereby reducing its expression. We found that pp242 significantly (by 3-fold) abrogated Bortezomib-induced p21 expression (Fig. 5A; see also Fig. S7A). Depleting eIF4E, eIF4GI, or mTOR also reduced p21 expression under Bortezomib conditions (Fig. 5D, panels a, and data not shown),

corroborating the pp242 results. This negative effect on Bortezomib-mediated p21 upregulation was due, at least in part, to a reduced steady state p21 mRNA level (Fig. 5B and E; see Fig. S7B; also data not shown), which reflects the inhibition of SG formation under these conditions (Fig. 1 and 2). These results indicate that pp242 impairs SG formation and blocks its downstream p21 upregulation pathway, which together could contribute in sensitizing cancer cells to Bortezomib-mediated apoptosis.

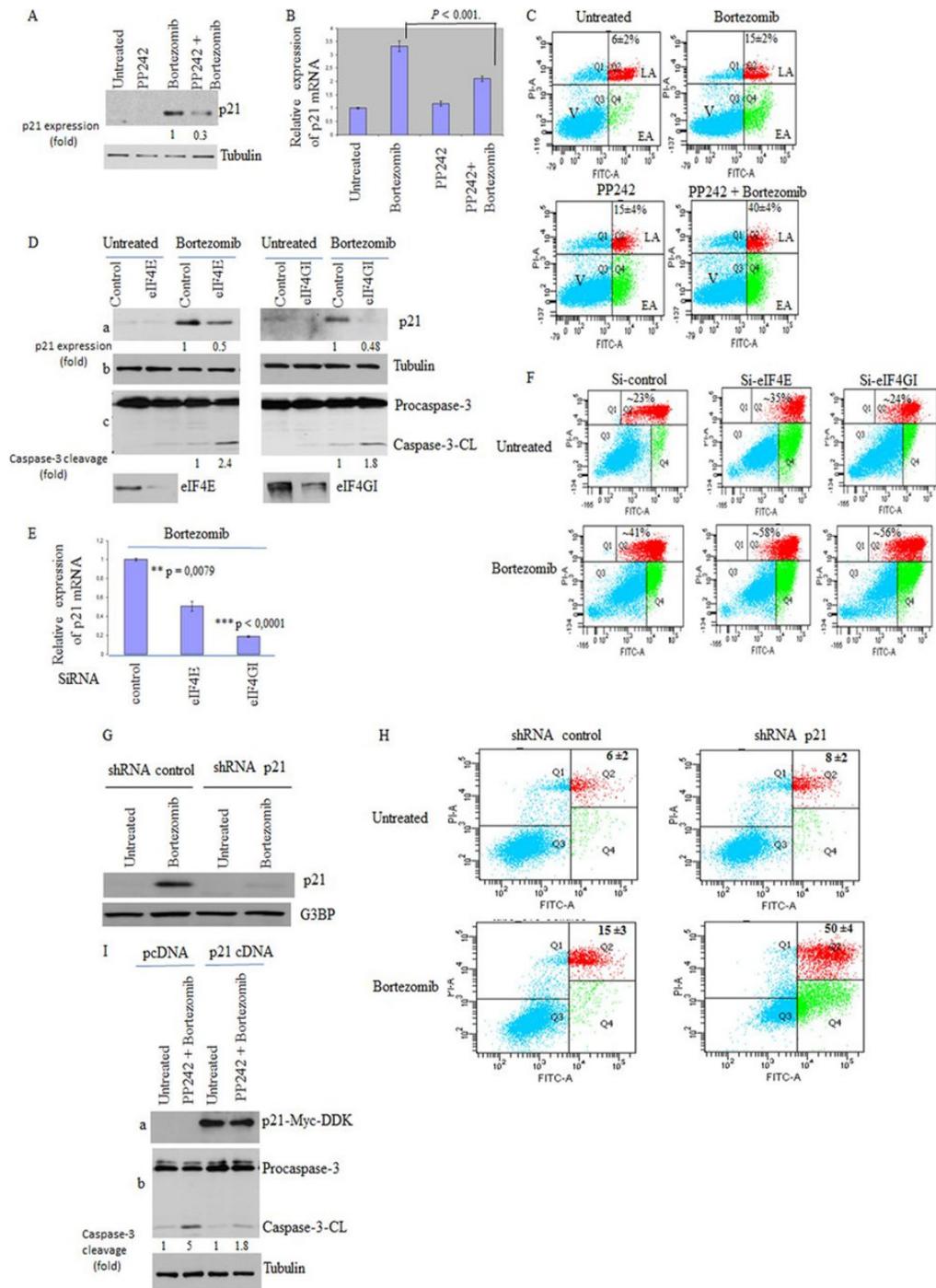


FIG 5. PP242 and depletion of either eIF4E or eIF4GI downregulate the SG-associated p21 pathway and sensitize cancer cells to Bortezomib.

(A) HeLa cells were incubated with pp242 (2.5 μ M) or with Bortezomib (2 μ M) or with both compounds for 16 h. Cells were then lysed and proteins resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting for p21 expression. Tubulin serves as a loading control. (B) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) of p21 mRNA. Following treatment with Bortezomib (2 μ M) or with pp242 (2.5 μ M) or with both compounds for 4 h, cells were collected and total RNA content was then isolated. The amount of p21 was quantified by qRT-PCR relative to GAPDH mRNA using the threshold cycle ($\Delta\Delta$ CT) method. Results are expressed as the means SEM (error bars) of triplicate measurements. (C) HeLa cells were treated as described for panel A, collected, and 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 means SEM of the results of 3 independent experiments. V, viable cells; EA, early apoptosis; LA, late apoptosis. (D to F) HeLa cells were treated with nonspecific or eIF4E- or eIF4GI-specific siRNAs for 96 h. Cells were treated with 2 μ M Bortezomib for 16 h. (D) Cells were then lysed, and extracted proteins were analyzed by Western blotting for the expression of p21, eIF4E, and eIF4GI as well as for caspase-3 cleavage. Tubulin serves as a loading control. (E) qRT-PCR of p21 mRNA as described above. (F) Cells were stained with annexin V-FITC and PI as described above and analyzed by flow cytometry. (G and H) Depletion of p21 promotes Bortezomib-mediated apoptosis. (G) HeLa cells stably expressing either shRNA control or shRNA p21 were treated with Bortezomib and then collected. Proteins extracts were then prepared and analyzed for p21 expression using anti-p21 antibodies. G3BP1 serves as a loading control. (H) HeLa cells stably expressing either shRNA control (left panel) or shRNA p21 (right panel) were treated with Bortezomib for 16 h and then analyzed by staining with annexin V-FITC and PI and flow cytometry.

The percentage of apoptotic cells is indicated at the top of each panel, and the values represent the means standard errors of the means (SEM) of the results of 3 independent experiments. (I) Overexpression of p21 reduces the effects of pp242 in promoting Bortezomib-mediated apoptosis. HeLa cells transfected with either p21-myc-DDK or pcDNA for 20 h were treated with Bortezomib (2 μ M) or with pp242 (2.5 μ M) and Bortezomib (2 μ M) for 16 h. Cells were then lysed, and extracted proteins were analyzed by Western blotting for p21 expression and caspase-3 cleavage. Tubulin serves as a loading control.

To test this assumption, HeLa and MCF-7 cells were treated with pp242 and exposed to Bortezomib (2 μ M), and apoptosis was then measured with an annexin V assay. Treatment with pp242 did not significantly induce apoptosis in either HeLa cells (Fig. 5C) or MCF-7 cells (see Fig. S7C in the supplemental material), indicating that mTOR inactivation is at best a weak inducer of apoptosis, in keeping with previous data (50). Following incubation with Bortezomib, however, pp242 promoted apoptosis in a high percentage (\sim 40%) of both HeLa (Fig. 5C) and MCF-7 (see Fig. S7C) cells compared to incubation with Bortezomib alone (\sim 15% to 20%). Downregulating eIF4E or eIF4GI also promoted apoptosis during Bortezomib treatment of HeLa cells, as assessed by caspase-3 cleavage and annexin V experiments (panels c of Fig. 5D and F), and we obtained similar results upon mTOR depletion (data not shown). These results suggest that suppression of SG either with pp242 or through depletion of eIF4E and eIF4GI sensitizes cancer cells to Bortezomib-mediated apoptosis, which could involve p21 downregulation, although disruption of additional antiapoptotic pathways is likely to be involved. In keeping with our assumption, however, we found that depletion of p21 using specific shRNAs (Fig. 5G) significantly (\sim 40%) promoted apoptosis under Bortezomib treatment conditions, corroborating the pp242 results (Fig. 5H). Moreover, overexpressing p21 (we used a plasmid-encoding p21 that lacks regulatory 5' and 3' [UTR] to ensure its constitutive expression) (Fig. 5I, panel a) partially reduced Bortezomib-mediated apoptosis of HeLa cells, despite TORKinibs treatment (Fig. 5I, panel b). Overall, these results indicate that pp242 sensitizes cancer cells to Bortezomib-mediated cell death *in vitro*, at least in part by down regulating the SG-associated p21 antiapoptotic pathway.

The results described above may also indicate a negative effect of this mTOR/SG inhibitor on the growth of chemoresistant tumors. We assessed this hypothesis in

chick embryos using the chick chorioallantoic membrane (CAM) in vivo assay (74–77). This in vivo model for tumor growth benefits from the fact that the CAM, a highly vascularized tissue that surrounds the chicken embryo, is in an external and easily accessed position. Moreover, CAM assays allow rapid assessment of the effects of chemotherapeutic drugs on tumor formation by the use of human cancer cells grafted onto the CAM. Grafting of HeLa cells onto the CAM resulted of tumor formation in nearly all of the 100 embryos used for the experiments. Control experiments show that Bortezomib alone does not affect HeLa tumor formation in CAM assays (Fig. 6A and B). This result is consistent with previous data showing that Bortezomib is inefficient for treating solid tumors (16). pp242 treatment has a slight effect on tumor growth, corroborating recent results obtained using mouse models (69).

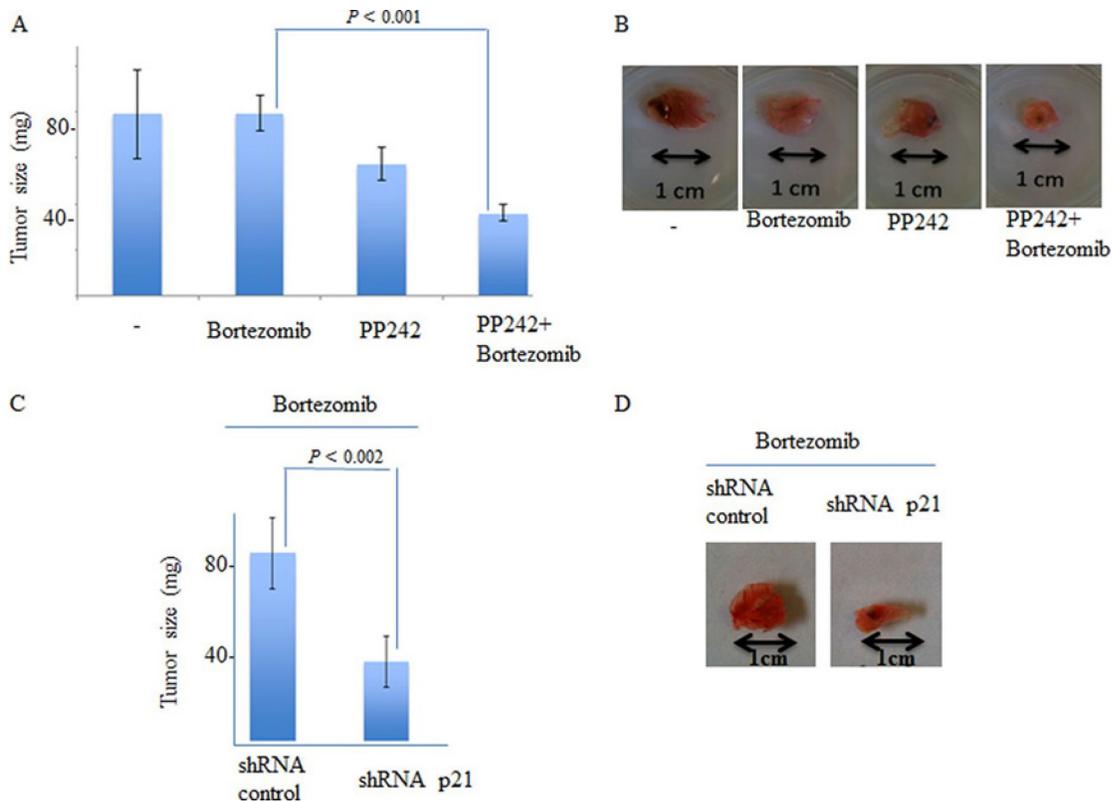


FIG 6. Both depletion of p21 and depletion of pp242 inhibit the formation of Bortezomib-resistant tumors in the chick CAM assay.

(A and B) HeLa cells (1×10^6 cells/egg) were inoculated directly onto the CAM tissue of 10-day-old embryos. Bortezomib (60 ng/egg) or pp242 (80 ng/egg) or both were then injected i.v. on day 11 into a total of 100 embryos as described in Materials and Methods. At day 17, embryos were euthanized and decapitated and the tumor wet weight was recorded. (B) Representative tumors are shown. (C and D) p21 depletion inhibits the formation of Bortezomib-resistant tumors in the chick CAM assay. HeLa cells that were stably expressing either shRNA control (left panel) or shRNA p21 (right panel) (1×10^6 cells/egg) were inoculated directly onto the CAM tissue of 10-day-old embryos. Bortezomib (60 ng/egg) was then injected i.v. on day 11 in a total of 100 embryos as described in Materials and Methods. (C) At day 17, embryos were euthanized and decapitated and the tumor wet weight was recorded. Representative tumors are shown in panel D.

There was, however, an ~2-fold reduction in the growth of HeLa tumors in the CAM assay when the treatment also combined Bortezomib and pp242 (Fig. 6A and B), indicating that mTOR inactivation may synergistically inhibit solid-tumor growth with Bortezomib. We then tested if depleting p21, one among the other possible downstream effectors of mTORC1-SG pathway, could also inhibit the growth of solid tumors theCAM assay. For this, we used our HeLa cells expressing either control shRNA or p21 shRNA (Fig. 5G), which we grafted onto the CAM. Grafting of HeLa cells expressing either control shRNA or p21 shRNA onto the CAM resulted in the formation of tumors of similar sizes in nearly all of the 100 embryos used for the experiments (data not shown). Under Bortezomib treatment conditions, however, there was an ~2-fold reduction in the growth of HeLa tumors expressing p21 shRNAs in the CAM assay when they were treated with Bortezomib compared to the growth of HeLa tumors expressing control shRNAs (Fig. 6C and D). We obtained similar results using HeLa cells stably expressing different p21 shRNAs (data not shown). These results indicate that p21 downregulation synergistically inhibits solid-tumor growth with Bortezomib treatment, further suggesting that it may contribute to the effect of pp242 in inhibiting the growth of solid tumors when such treatment is combined with Bortezomib treatment. Overall, our studies show that mTOR inactivation by pp242 inhibits Bortezomib-induced SG formation and resistance to apoptosis in vitro and reduces tumor formation in vivo when such treatment is combined with Bortezomib treatment.

1.6. Discussion

The role of the mTOR-eIF4E pathway in regulating SG formation has never been documented to date. Here we established a novel mechanism of SG formation which relies on mTORC1 activity. First, we identified the cap-binding protein eIF4E and its interactor eIF4GI as two novel factors involved in SG formation. mTORC1 specifically promotes this eIF4E-4GI-mediated formation of SG via 4E-BP1 phosphorylation. In support of this result, overexpression of hypophosphorylated 4E-BP1 suppressed SG formation by preventing eIF4E interactions with eIF4GI, and depletion of 4E-BP1 rescued both SG formation and the eIF4E-4GI interaction in pp242-treated cells. Finally, disrupting formation of SG by depletion of eIF4E or eIF4GI blocks the SG-associated antiapoptotic p21 pathway and sensitizes cancer cells to Bortezomib mediated cell death in vitro. We recapitulated these results by inactivating mTOR with pp242, which prevented tumor formation in vivo.

The eIF4E-eIF4GI interaction promotes SG formation under mild stress conditions: role of mTORC1. The composition of SG comprises most translation initiation factors, including the three eIF4F components 4G, 4E, and 4A. However, the requirement of translation initiation factors in SG formation is still largely unknown. Our present study has identified eIF4E and eIF4GI as two novel factors required for formation of SG under mild stress conditions. eIF4E is responsible for the early recognition of capped mRNAs during translation initiation, and this interaction is stabilized by eIF4GI, resulting in the activation of translation initiation. The interaction between eIF4E and eIF4GI is mainly regulated by mTORC1-mediated phosphorylation of 4E-BP1. Our results established SG formation as representing a novel role of the mTORC1-mediated eIF4E-eIF4GI interaction in stress response. First, we found that depletion of either the mTORC1-defining Raptor component or mTOR itself significantly alters SG formation under mild stress conditions in different cancer cell lines (Fig. 2; see also Fig. S1 in the supplemental material). A recent report described the localization of mTORC1 components in mammalian SG induced by severe stress conditions such as the presence of 500 μ M arsenite (63). Under the mild stress

conditions used here, however, mTOR is barely detected in SG (see Fig. S2 in the supplemental material), making unlikely the possibility that mTORC1 could serve by itself as a scaffolding complex for formation of SG. Second, pp242-mediated mTORC1 inactivation abrogates both eIF4E-eIF4GI interactions and SG formation (Fig. 2 and 3). Both SG formation and eIF4E-4GI interactions are, however, rescued in 4E-BP1-depleted cells (Fig. 3A and B; see also Fig. S5A and B in the supplemental material), demonstrating that this effect of pp242 on SG formation is likely due to eIF4E sequestration by 4E-BP1, which competitively disrupts eIF4E-eIF4GI interactions. Our results thus suggest a novel role of hypophosphorylated 4E-BP1 in inhibiting formation of SG via eIF4E sequestration, a notion which is further supported by overexpression experiments. As expected, expression of 4E-BP1 inhibited formation of SG upon arsenite treatment (Fig. 4A and B). Expression of constitutively hypophosphorylated 4E-BP1 had a more drastic effect in preventing SG formation. This indicates that the antagonistic effect of 4E-BP1 on SG formation is mediated by its hypophosphorylated form, which sequesters eIF4E, thereby preventing its interaction with eIF4GI (see Fig. S5 in the supplemental material). Finally, expression of a 4E-BP1 mutant that cannot bind eIF4E fails to inhibit eIF4E-eIF4GI interactions (see Fig. S5F in the supplemental material), thereby preserving formation of SG upon exposure to stress (Fig. 4A). We thus speculate that pp242-mediated hypophosphorylation of 4E-BP1 suppresses SG formation through disruption of the eIF4E-eIF4GI interaction. In a recent study, it was reported that treatment of cells with selenite induces the sequestration of eIF4E by 4E-BP1 and promotes formation of noncanonical SG. These SG were referred by those authors as type 2 SG, as opposed to the canonical SG induced by arsenite (78). Selenite induced type 2 SG lack several canonical SG components and have a reduced size compared to type 1 canonical SG. Formation of selenite-induced type 2 SG was shown to be reinforced by phosphorylation of eIF2 α but reduced upon 4E-BP1 depletion, suggesting a possible role of phosphorylation of

both eIF2 α and 4E-BP1 in promoting formation of selenite-induced type 2 SG. However, this depletion of 4E-BP1 does not prevent formation of SG induced by arsenite (Fig. 3), corroborating previous data (78). Depletion of 4E-BP1 also had no effect on Bortezomib-induced SG (see Fig. S5A in the supplemental material), ruling out an essential role for this protein in promoting formation of SG under both arsenite and Bortezomib treatment conditions. Finally, 4E-BP1 is excluded from SG induced by either arsenite (Fig. 4) or Bortezomib (see Fig. S5 in the supplemental material), which is consistent with a dispensable role of this protein in the formation of SG. Overall, our study identified 4E-BP1 as a novel SG-antagonizing factor under conditions of mild treatment with arsenite and Bortezomib, whose activation by mTORC1 inhibitor pp242 prevents formation of SG. Neither pp242 nor torin 1 induces phosphorylation of eIF2 α , and both have a minimal effect on general translation initiation (see Fig. S4 in the supplemental material), in keeping with previous data showing that mTORC1 inhibition by either drug selectively impairs the translation of a subset of mRNAs (52, 64, 79, 80). The best-characterized mTORC1-mRNA targets are those encoding factors of cell proliferation and protein synthesis (52, 64). Translation of mTORC1-mRNA targets is highly dependent on the eIF4E-eIF4GI interaction, and loss of this interaction with pp242 reduces the capacity of eIF4E to bind mTORC1-mRNA targets much more than that seen with other mRNAs, explaining why mTORC1 inactivation selectively suppresses their translation. mRNAs being core components of SG, one likely mechanism by which inactivation of mTORC1 prevents formation of SG could involve the release of mTORC1-mRNA targets from eIF4E, which otherwise would promote recruitment of specific SG-promoting factors. eIF4E-4GI complexes might also be required for formation of SG through recruitment of key SG-promoting factors by direct interactions. This is consistent with recent studies reporting interactions between specific SG-promoting factors, many of which are translation repressors, with either eIF4E or yeast eIF4G (81–83). We thus propose as a model (Fig. 7) such that under stress conditions, eIF4E-eIF4GI complexes could serve as a scaffold for recruitment of specific translation repressors, not identified yet, in an mTORC1-dependent manner. This binding would then stall the translation initiation complexes whose accumulation leads to SG formation. Future experiments are needed to establish how mTORC1-

mediated eIF4E-eIF4GI interactions contribute to the formation of SG. mTOR inhibition as a possible strategy to circumvent chemoresistance. Our results established that depletion of either eIF4E or eIF4GI, as well as inhibition of the oncogenic mTOR pathway, impairs Bortezomib-induced SG. This suggests that mTORC1-dependent eIF4E-eIF4GI complex formation plays an essential role in SG assembly under conditions of treatment with a therapeutically relevant proteasome inhibitor. SG formation has recently been shown to suppress cancer cell death in response to chemotherapeutic and genotoxic drugs (5, 6, 10), which could explain the previously described role of SG in promoting tumor cell radioresistance (1). We have now shown that disrupting the mTORC1-eIF4E-4GI pathway either using pp242 or through depletion of eIF4E and eIF4GI or mTOR itself prevents Bortezomib-induced SG (Fig. 2 and 4), thereby downregulating its associated p21 antiapoptotic pathway in cancer cells. In keeping with these results, both the presence of pp242 and depletion of eIF4E, eIF4GI, or mTOR sensitize cancer cells to apoptosis in vitro (Fig. 5 and data not shown). We attempted to rescue apoptosis resistance to Bortezomib in eIF4E- or eIF4GI-depleted cells by overexpressing p21. However, and despite our efforts, we could not achieve conditions that allowed reproducible efficient depletion of either eIF4E or eIF4GI upon overexpression of p21, precluding statistical analysis of rescuing apoptosis resistance to Bortezomib. Nevertheless, and in agreement with our results showing that p21 downregulation sensitizes cancer cells to Bortezomib in vitro (Fig. 5), overexpression of p21 partially reduced Bortezomib-mediated apoptosis despite treatment with pp242. Thus, downregulation of p21 contributes to the effects of pp242 in sensitizing cancer cells to Bortezomib, although additional pathways could be involved. Finally, and in keeping with the results described above, pp242 suppresses formation of Bortezomib-resistant tumors in chick embryos (Fig. 6). The present work has thus identified a novel role for the oncogenic mTOR-eIF4E-eIF4GI pathway in promoting resistance to Bortezomib. mTORC1-mediated formation of SG might constitute an additional

pathway by which mTOR induces such chemoresistance. It will be interesting to determine whether targeting the mTORC1-eIF4E-eIF4GI pathway might sensitize cancer cells to other therapeutic conditions resulting in SG formation, such as radiation therapy. In addition to Bortezomib, other chemotherapeutic drugs are likely to induce SG, whose formation could contribute to apoptosis resistance. Further investigations will help to determine if mTORC1 has a general role in promoting the induction of SG formation by relevant chemotherapeutic drugs and associated chemoresistance. These findings should encourage a broader evaluation of the efficacy of TORKinibs in sensitizing chemoresistant tumors to various drugs.

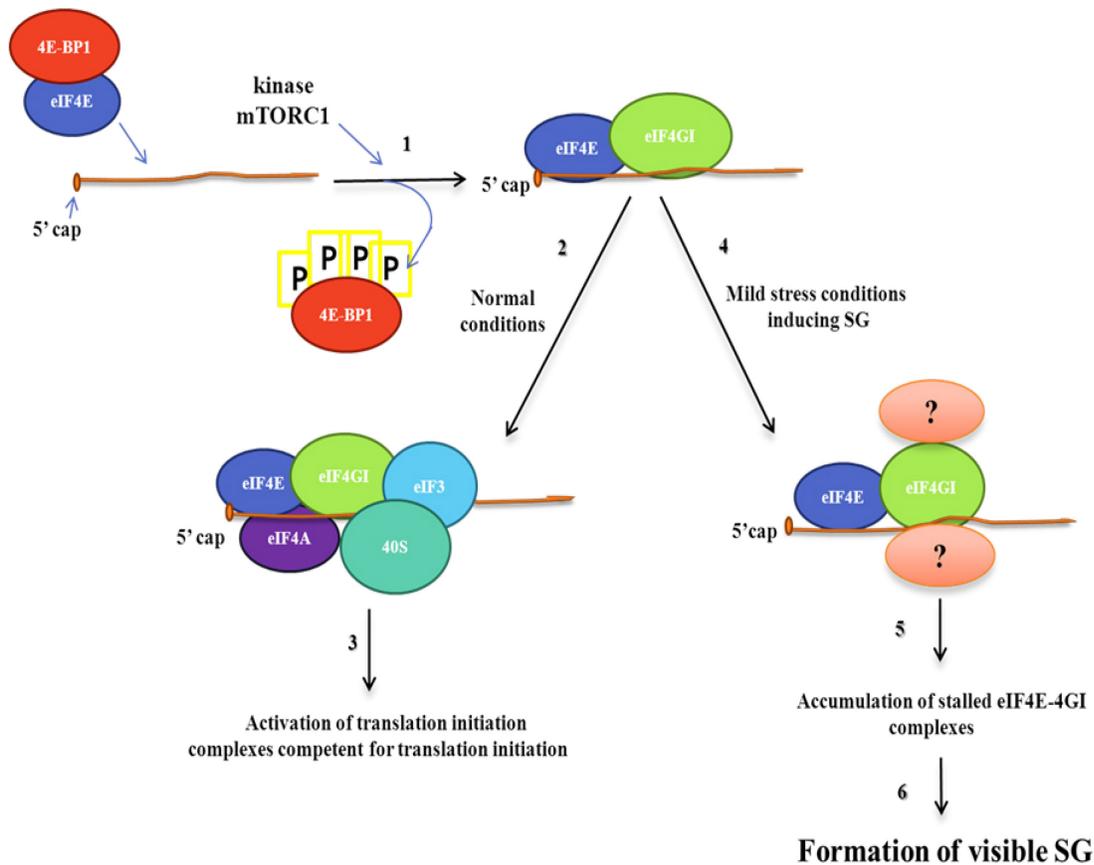


FIG 7 Our working model of mTORC1-eIF4E-eIF4GI-dependent mode of SG assembly. Under both normal and SG-inducing stress conditions, mTORC1 drives formation of eIF4E-eIF4GI translation initiation complexes through phosphorylation of its 4E-BP1 target (1). Under normal growth conditions, eIF4E-

4GI complexes are joined by 40S ribosomes at an early step of translation initiation (2 and 3). Under mild stress conditions inducing SG, eIF4E-4GI complexes may serve as scaffolding for the recruitment of unidentified factors in an mTORC1-dependent manner (4). This binding then stalls eIF4E-4GI complexes in an inactive status (5) and results in accumulation leading to formation of SG (6).

1.7. Acknowledgments

We are grateful to Imed Gallouzi (McGill University) for providing the anti-G3BP1 and to Edward Khandjian and Jean-Yves Masson (Laval University) for their gift of anti-FXR1 and anti-histone 3 antibodies, respectively. We are thankful to Anne Cammas and Sergio Di Marco (McGill University) for their helpful advice with polysomes. We also thank Yves Labelle and Richard Poulin (CRCHU) for editing the manuscript. This work was supported by a Canadian Institute Health Research (CIHR) grant (MOP-79334) to R.C.-G. and by both CIHR grant MOPIC093226- CBT and Canadian Foundation for Innovation grant MOPGF091050 to R.M. R.M. is a recipient of a CIHR New Investigator Scholarship award.

1.8. Footnotes

We declare that no competing interests exist.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01517-12>.

1.9. References

1. 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.
2. Gardner LB. 2008. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol. Cell. Biol.* 28:3729–3741.
3. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, Tanaka J, Gallouzi I, Pelletier J. 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 17:4212–4219.
4. McInerney GM, Kedersha NL, Kaufman RJ, Anderson P, Liljestrom P. 2005. Importance of eIF2 α phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell* 16:3753–3763.
5. Fournier MJ, Gareau C, Mazroui R. 2010. The chemotherapeutic agent Bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int.* 10:12. doi:10.1186/1475-2867-10-12.
6. Gareau C, Fournier MJ, Filion C, Coudert L, Martel D, Labelle Y, Mazroui R. 2011. p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to Bortezomib mediated apoptosis. *PLoS One* 6:e20254. doi:10.1371/journal.pone.0020254.
7. 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.
8. Anderson P, Kedersha N. 2006. RNA granules. *J. Cell Biol.* 172:803–808.
9. Anderson P, Kedersha N. 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33:141–150.
10. 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.
11. 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.* 25:2450–246.
12. 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.

13. McConkey DJ, Zhu K. 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist. Updat.* 11:164 –179.

14. Richardson PG, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, Munshi N, Anderson KC. 2008. Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8:1053–1072.

15. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O. 2008. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin. Invest. Drugs* 17:879–895.

16. Caravita T, de Fabritiis P, Palumbo A, Amadori S, Boccadoro M. 2006. Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3:374 –387.

17. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, Albanell J. 2006. Differential cellular and molecular effects of Bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5:665– 675.

18. Guertin DA, Sabatini DM. 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci. Signal.* 2:pe24. doi:10.1126/scisignal.267pe24.

19. Laplante M, Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274 –293.

20. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rugg MA, Hall A, Hall MN. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6:1122–1128.

21. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137:873– 886.

22. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptorindependent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14: 1296–1302.

23. Takahara T, Hara K, Yonezawa K, Sorimachi H, Maeda T. 2006. Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region. *J. Biol. Chem.* 281: 28605–28614.

24. Wang L, Rhodes CJ, Lawrence JC, Jr. 2006. Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1. *J. Biol. Chem.* 281:24293–24303.
25. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* 38:768–774.
26. Zhang HH, Lipovsky AI, Dibble CC, Sahin M, Manning BD. 2006. S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol. Cell* 24:185–197.
27. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177–189.
28. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163–175.
29. Zhou H, Huang S. 2010. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11:409–424.
30. Richter JD, Sonenberg N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433:477–480.
31. Sonenberg N. 2008. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem. Cell Biol.* 86:178–183.
32. Haghghat A, Sonenberg N. 1997. eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J. Biol. Chem.* 272:21677–21680.
33. Haghghat A, Svitkin Y, Novoa I, Kuechler E, Skern T, Sonenberg N. 1996. The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J. Virol.* 70:8444–8450.
34. Haghghat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N. 1995. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 14:5701–5709.
35. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 13:1422–1437.
36. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. 2004. eIF4E—from translation to transformation. *Oncogene* 23:3172–3179.
37. Rong L, Livingstone M, Sukarieh R, Petroulakis E, Gingras AC, Crosby K, Smith B, Polakiewicz RD, Pelletier J, Ferraiuolo MA, Sonenberg N. 2008. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA* 14:1318–1327.
38. Rousseau D, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N. 1996. The eIF4E binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* 13:2415–2420.

39. Averous J, Proud CG. 2006. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 25:6423– 6435.
40. Huang S, Houghton PJ. 2003. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:371–377.
41. Janus A, Robak T, Smolewski P. 2005. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10:479–498.
42. Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N. 2006. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br. J. Cancer* 94:195–199.
43. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG. 2008. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res.* 68:631–634.
44. Graff JR, Konicek BW, Vincent TM, Lynch RL, Monteith D, Weir SN, Schwier P, Capen A, Goode RL, Dowless MS, Chen Y, Zhang H, Sissons S, Cox K, McNulty AM, Parsons SH, Wang T, Sams L, Geeganage S, Douglass LE, Neubauer BL, Dean NM, Blanchard K, Shou J, Stancato LF, Carter JH, Marcusson EG. 2007. Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J. Clin. Invest.* 117:2638 –2648.
45. Konicek BW, Dumstorf CA, Graff JR. 2008. Targeting the eIF4F translation initiation complex for cancer therapy. *Cell Cycle* 7:2466 –2471.
46. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. 2006. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25:6416–6422.
47. Nathan CO, Amirghahari N, Rong X, Giordano T, Sibley D, Nordberg M, Glass J, Agarwal A, Caldito G. 2007. Mammalian target of rapamycin inhibitors as possible adjuvant therapy for microscopic residual disease in head and neck squamous cell cancer. *Cancer Res.* 67:2160 –2168.
48. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM. 2009. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 7:e38. doi:10.1371/journal.pbio.1000038.
49. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284:8023– 8032.
50. Grosso S, Pesce E, Brina D, Beugnet A, Loreni F, Biffo S. 2011. Sensitivity of global translation to mTOR inhibition in REN cells depends on the equilibrium

between eIF4E and 4E-BP1. *PLoS One* 6:e29136. doi:10.1371/journal.pone.0029136.

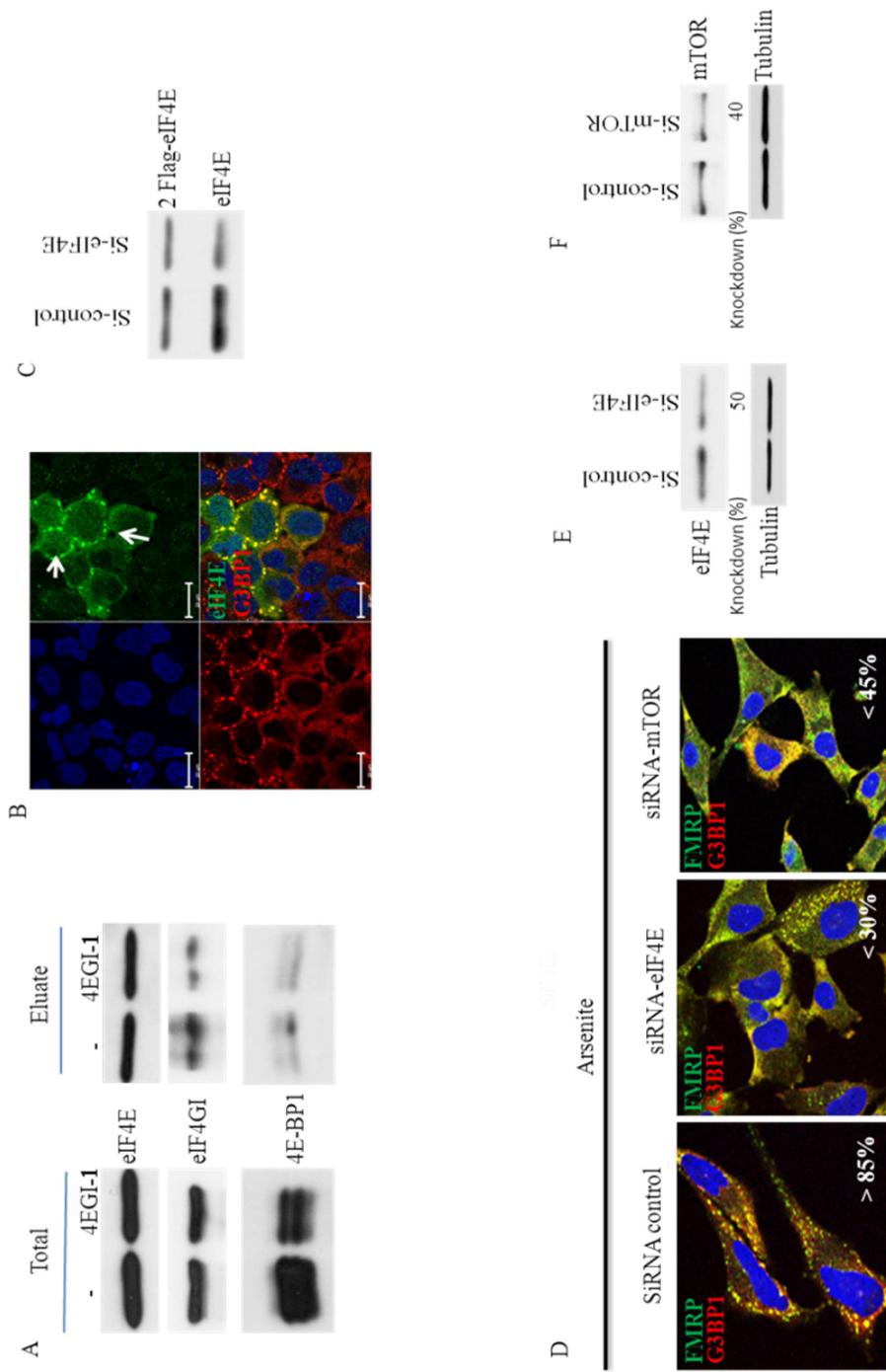
51. Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, Meyuhas O, Shokat KM, Ruggero D. 2010. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 17:249–261.
52. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485:109–113.
53. Mokaš S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, Arya P, Kaufman RJ, Pelletier J, Mazroui R. 2009. Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol. Biol. Cell* 20:2673–2683.
54. Chen L, Aktas BH, Wang Y, He X, Sahoo R, Zhang N, Denoyelle S, Kabha E, Yang H, Freedman RY, Supko JG, Chorev M, Wagner G, Halperin JA. 2012. Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation. *Oncotarget* 3:869–881.
55. Moerke NJ, Aktas H, Chen H, Cantel S, Reibarkh MY, Fahmy A, Gross JD, Degterev A, Yuan J, Chorev M, Halperin JA, Wagner G. 2007. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* 128:257–267.
56. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW. 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* 11:3007–3017.
57. Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160:823–831.
58. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P. 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* 13:195–210.
59. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P. 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151:1257–1268.
60. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147:1431–1442.
61. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ. 2005. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J. Biol. Chem.* 280:16925–16933.

62. Holcik M, Sonenberg N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:318–327.
63. Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L. 2013. Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell* 152:791–805.
64. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. 2010. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1804:433–439.
65. Sukarieh R, Sonenberg N, Pelletier J. 2009. The eIF4E-binding proteins are modifiers of cytoplasmic eIF4E relocalization during the heat shock response. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C1207–C1217.
66. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 328:1172–1176.
67. Patel J, McLeod LE, Vries RG, Flynn A, Wang X, Proud CG. 2002. Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors. *Eur. J. Biochem.* 269:3076–3085.
68. Wu XN, Wang XK, Wu SQ, Lu J, Zheng M, Wang YH, Zhou H, Zhang H, Han J. 2011. Phosphorylation of Raptor by p38beta participates in arsenite-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation. *J. Biol. Chem.* 286:31501–31511.
69. Alain T, Morita M, Fonseca BD, Yanagiya A, Siddiqui N, Bhat M, Zammit D, Marcus V, Metrakos P, Voyer LA, Gandin V, Liu Y, Topisirovic I, Sonenberg N. 2012. eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer Res.* 72:6468–6476.
70. Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC, Jr. 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266:653–656.
71. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr, Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762–767.
72. Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N. 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 273:14002–14007.
73. Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* 36:932–941.

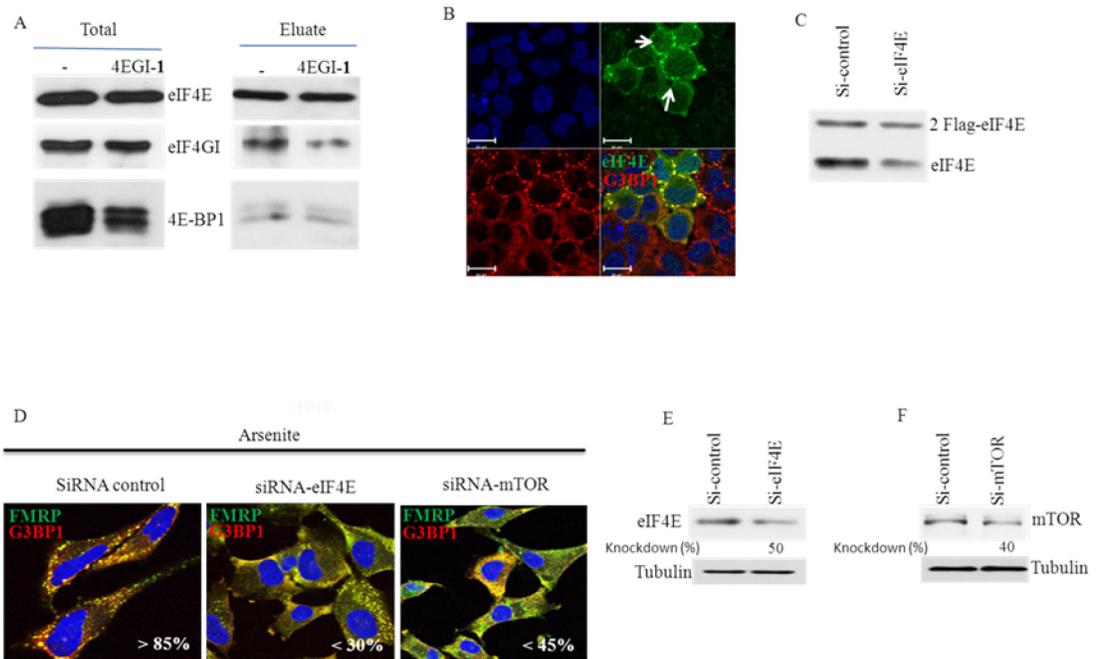
74. Bragado P, Estrada Y, Sosa MS, Avivar-Valderas A, Cannan D, Genden E, Teng M, Ranganathan AC, Wen HC, Kapoor A, Bernstein E, Aguirre- Ghiso JA. 2012. Analysis of marker-defined HNSCC subpopulations reveals a dynamic regulation of tumor initiating properties. *PLoS One* 7:e29974. doi:10.1371/journal.pone.0029974.
75. Gloesenkamp CR, Nitzsche B, Ocker M, Di Fazio P, Quint K, Hoffmann B, Scherubl H, Hopfner M. 2012. AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int. J. Oncol.* 40:876–888.
76. Petitclerc E, Deschesnes RG, Cote MF, Marquis C, Janvier R, Lacroix J, Miot-Noirault E, Legault J, Mounetou E, Madelmont JC, C-Gaudreault R. 2004. Antiangiogenic and antitumoral activity of phenyl-3-(2- chloroethyl)ureas: a class of soft alkylating agents disrupting microtubules that are unaffected by cell adhesion-mediated drug resistance. *Cancer Res.* 64:4654–4663.
77. Ribatti D, Nico B, Cimpean AM, Raica M, Crivellato E, Ruggieri S, Vacca A. 19 April 2012. B16-F10 melanoma cells contribute to the new formation of blood vessels in the chick embryo chorioallantoic membrane through vasculogenic mimicry. *Clin. Exp. Med.* [Epub ahead of print.]
78. Fujimura K, Sasaki AT, Anderson P. 2012. Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of noncanonical stress granules. *Nucleic Acids Res.* 40:8099–8110.
79. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, Shi EY, Stumpf CR, Christensen C, Bonham MJ, Wang S, Ren P, Martin M, Jessen K, Feldman ME, Weissman JS, Shokat KM, Rommel C, Ruggero D. 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 485:55– 61.
80. Larsson O, Morita M, Topisirovic I, Alain T, Blouin MJ, Pollak M, Sonenberg N. 2012. Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:8977– 8982.
81. Hilliker A, Gao Z, Jankowsky E, Parker R. 2011. The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4FmRNA complex. *Mol. Cell* 43:962–972.
82. Rajyaguru P, She M, Parker R. 2012. Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins. *Mol. Cell* 45:244 –254.
83. Shih JW, Wang WT, Tsai TY, Kuo CY, Li HK, Wu Lee YH. 2012. Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/ PABP1 in stress granule assembly and stress response. *Biochem. J.* 441: 119–129.
84. Svitkin YV, Herdy B, Costa-Mattioli M, Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 2005. Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry sitemediated translation. *Mol. Cell. Biol.* 25:10556 –10565.

85. Yanagiya A, Suyama E, Adachi H, Svitkin YV, Aza-Blanc P, Imataka H, Mikami S, Martineau Y, Ronai ZA, Sonenberg N. 2012. Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol. Cell* 46:847–858.
86. Di Marco S, Hel Z, Lachance C, Furneaux H, Radzioch D. 2001. Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNFalpha mRNA impairs binding of the posttranscriptional regulatory protein HuR to TNF alpha mRNA. *Nucleic Acids Res.* 29:863– 871.

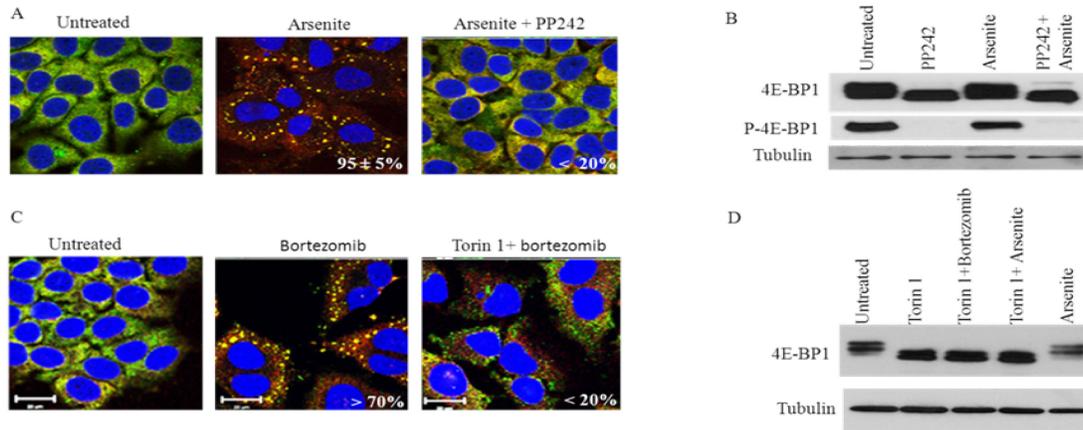
1.10. Supplementary materials



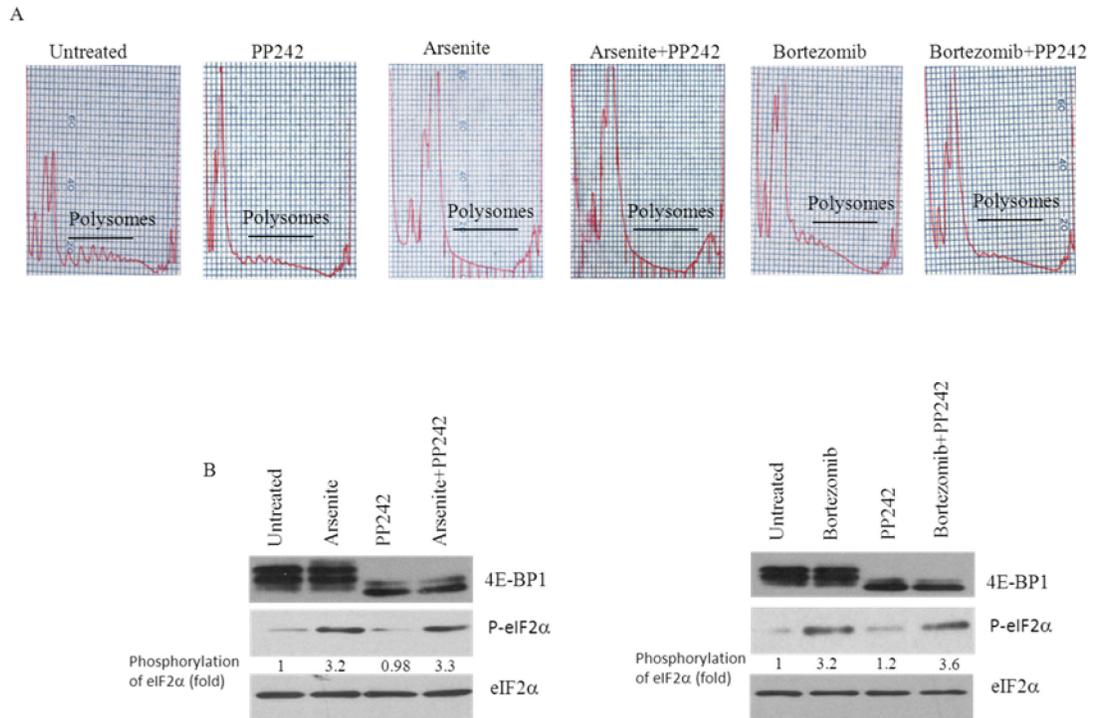
Supplementary data 1. (A) 4EGI disrupts eIF4E-4GI association as assessed by capbinding assays. HeLa cells were left untreated or were treated with 4EGI (250 μ M) for 7h. Cells were lysed and then incubated with m7GTP-Sepharose beads. Eluted proteins were analysed by Western blot using specific antibodies. Total = 1% of the input used for cap pull-down. (B-C) Rescue experiments. HeLa cells were treated with eIF4E-selective siRNAs then transfected with a pcDNA vector encoding murine eIF4E fused to 2 Flags. (B) Cells were then treated with 150 μ M arsenite, fixed, permeabilized and then processed for immunofluorescence using anti-eIF4E (green) and anti-G3BP (red) antibodies. Cells overexpressing Flag-eIF4E are shown. (C) Cells were lysed and protein extracts were prepared and analyzed by Western blot to detect eIF4E. (D-F) Depletion of either eIF4E or mTOR impairs formation of SG in MCF-7. MCF-7 cells were treated with either non-specific siRNAs or eIF4E-selective siRNAs or mTOR-specific siRNA for 96 h. (D) Cells were then treated with 250 μ M arsenite for 1 h. Cells were fixed, permeabilized and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (> 3 granules/cell) from 5 different fields and 5 different experiments containing a total of 2×10^3 cells is indicated at the bottom of the merged images. (E-F) Cells were lysed and protein extracts were prepared and analyzed by Western blot to detect eIF4E (E) and mTOR (F). Tubulin serves as a loading control. The percentage of eIF4E and mTOR knockdown was determined as above by densitometry quantification of the film signal and expressed as a percentage of total eIF2 α . The results are representative of 3 different experiments.



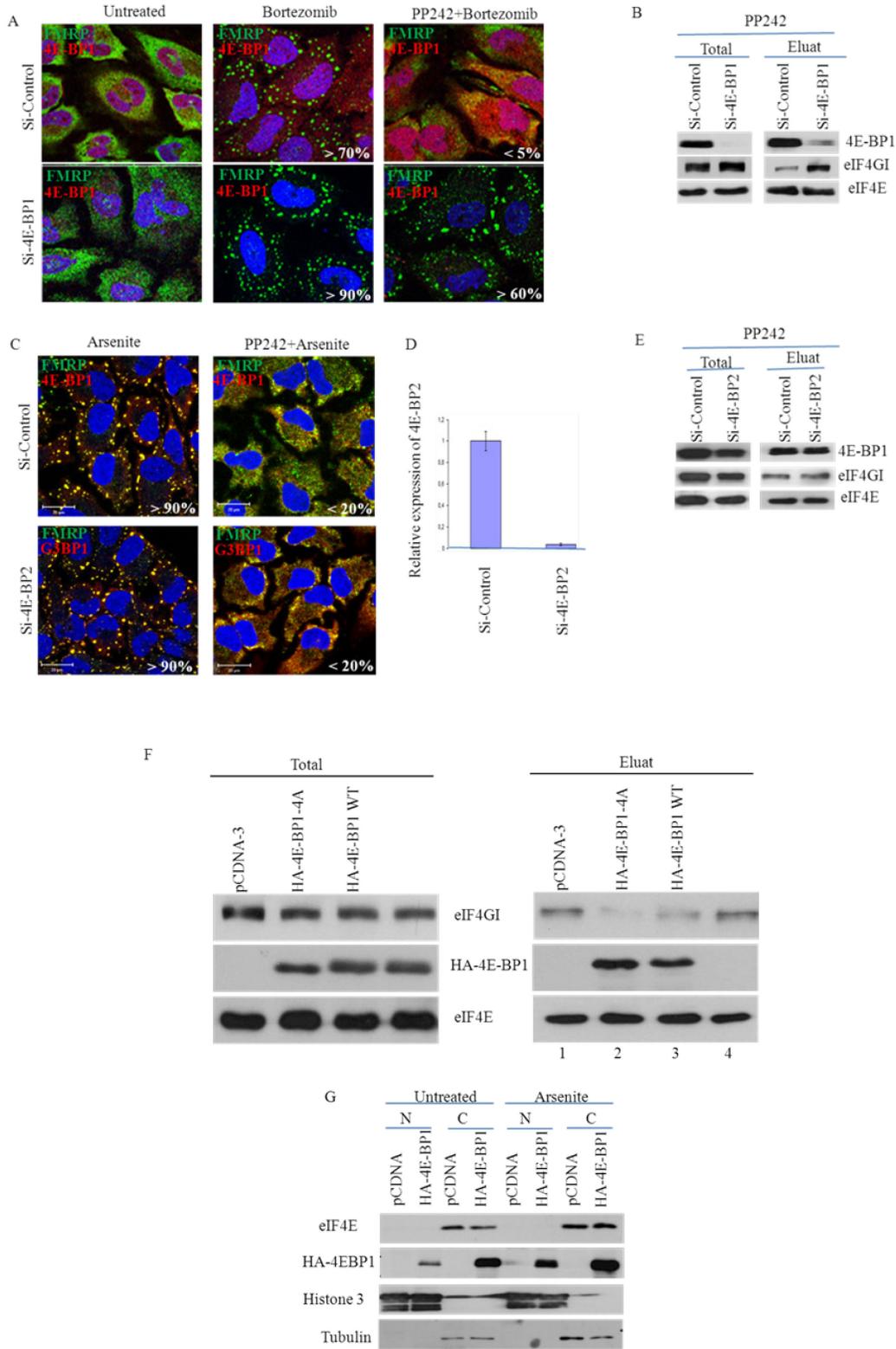
Supplementary data 2. Localization of mTOR in SG. Cells were treated with nonspecific or mTOR-selective siRNAs for 96 h and then were incubated with either 150 μ M arsenite for 1 h or with 2 μ M Bortezomib for 4 h. Cells were fixed, permeabilized and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP. Anti-mTOR antibodies were used to assess mTOR localization (left panels) and its depletion (right panels). The percentage of cells harboring SG (> 3 granules/cell) from 5 different fields and 5 different experiments containing a total of 2×10^3 cells is indicated at the bottom of the merged images.



Supplementary data 3. PP242 and Torin1 inhibit SG formation. (A-B) MCF-7 cells were treated with either pp242 (2.5 μ M) for 7 h, arsenite (250 μ M) for 1 h, or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 6 h before adding arsenite (250 μ M) for an additional 1 h. (A) Cells were then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. (B) MCF-7 cells were lysed and protein extracts were prepared and analyzed by Western blot for 4E-BP1 and phospho-4E-BP1 (S65). (C-D) HeLa cells were pretreated either with Torin 1 (0.1 μ M) for 4 h and then incubated with 2 μ M Bortezomib for 4 h (Torin 1+Bortezomib). As controls, cells were treated with 2 μ M Bortezomib for 4 h (Bortezomib). (C) Cells were processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP and anti-G3BP1 antibodies. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. (D) Cells were lysed and protein extracts were prepared and analyzed by Western blot to detect 4E-BP1. Tubulin serves as a loading control. All the results are representative of 3 different experiments. And, for all the experiments, the percentage of cells harboring SG (> 3 granules/cell) from 5 different fields and 3 different experiments containing a total of 1 x 10³ cells is indicated at the bottom of merged images.

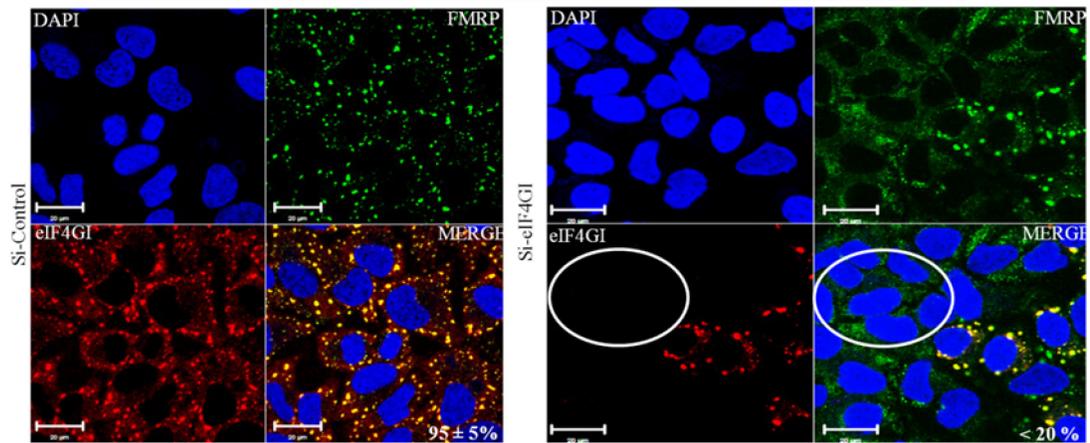


Supplementary data 4. The SG inhibitor pp242 has a modest effect on general translation initiation. HeLa were left untreated (left panels) or were treated with either pp242 (2.5 μ M) for 6 h, arsenite (150 μ M) for 1 h, or Bortezomib (2 μ M) for 4 h, or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 6 h before adding arsenite (150 μ M) for an additional 1 h, or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 2 h before adding Bortezomib (2 μ M) for an additional 4 h. (A) Sucrose gradient analysis of polysomes. Cytoplasmic extracts were prepared and sedimented through sucrose density gradients, which were then processed as described in "Material and Methods". The results are representative of 3 different experiments. (B) Western blot analysis of the input used in polysome analysis. The indicated proteins were detected using their corresponding antibodies.

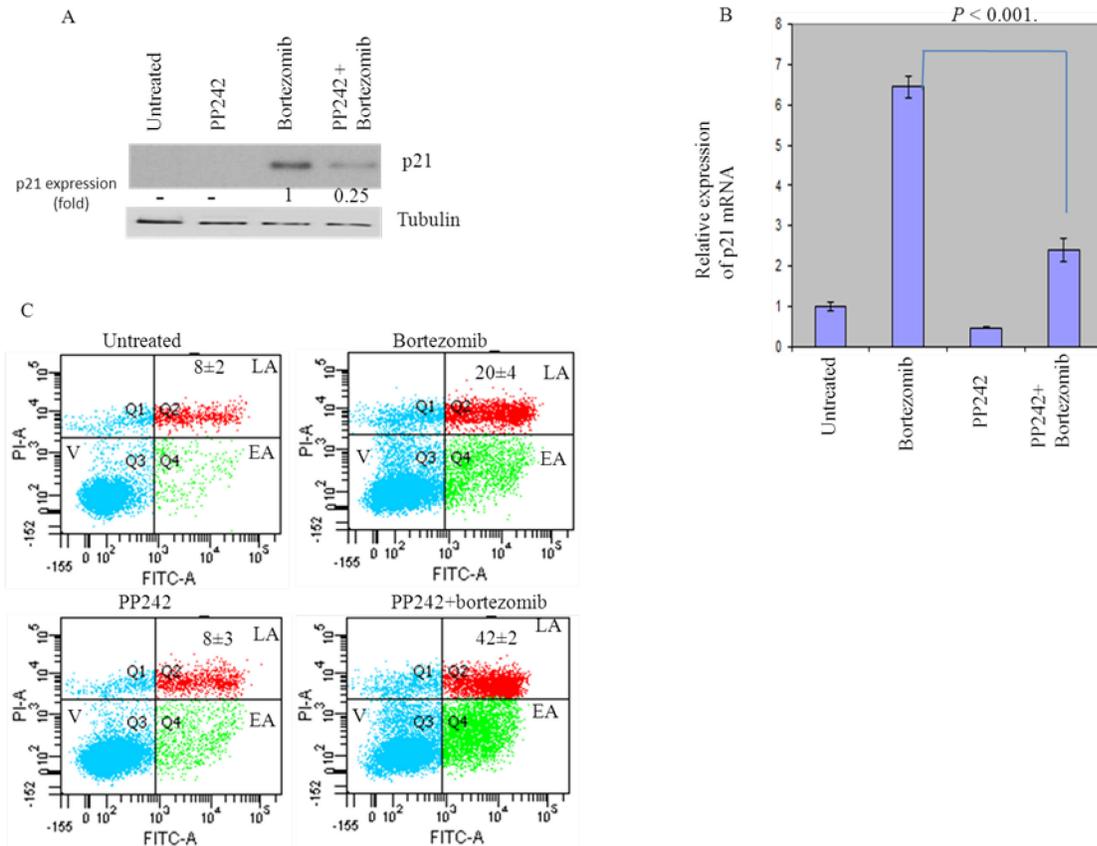


Supplementary data 5. (A-B) Depletion of 4E-BP1 rescues Bortezomib-SG formation and eIF4E-4GI interaction during mTOR inhibition. (A) HeLa cells were left untreated or were treated either with pp242 (2.5 μ M) for 6 h, or with Bortezomib (2 μ M) for 4 h, or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 2 h before adding Bortezomib (2 μ M) with pp242 (2.5 μ M) for an additional 4 h. Cells were then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP (green). Depletion of 4E-BP1 was assessed using anti-4EBP1 antibodies (red). Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (> 3 granules/cell) from 5 different fields and 3 different experiments containing a total of 1×10^3 cells is indicated at the bottom of merged images. (B) Cells were treated with non-specific or 4E-BP1-selective siRNAs for 96 h. Following treatment with pp242 (2.5 μ M) for 6 h, cells were lysed and the cell extract was incubated with m7GTP-Sepharose beads. Eluted proteins were analyzed by Western blot using anti-eIF4E and anti-eIF4GI antibodies. Depletion of 4E-BP1 was assessed using anti-4E-BP1 antibodies. Total= 1% of the input used for cap pull-down. (C-E) Depletion of 4E-BP2 does not rescue SG formation during mTOR inhibition. (C) HeLa cells were left untreated or were treated either with pp242 (2.5 μ M) for 7 h, or with arsenite (150 μ M) for 1 h, or were incubated with pp242 (2.5 μ M) for 6 h before adding arsenite (150 μ M) with pp242 (2.5 μ M) for an additional hour. Cells were then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP (green) and anti-G3BP1 (red) antibodies. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG (> 3 granules/cell) from 5 different fields and 3 different experiments containing a total of 1×10^3 cells is indicated at the bottom of merged images. (D) Depletion of 4E-BP2 was assessed qRT-PCR of 4E-BP2 mRNA. Cells were collected and total RNA content was then isolated. The amount of 4E-BP2 was quantified by qRT-PCR relative to GAPDH mRNA using the $\Delta\Delta$ Ct method. Results are expressed as the mean \pm SEM (error bars) of triplicate measurement. (E) Cells were treated with nonspecific or 4E-BP2-

selective siRNAs for 96 h. Following treatment with pp242 (2.5 μ M) for 6 h, cells were lysed and the cell extract was incubated with m7GTP-Sepharose beads. Eluted proteins were analyzed by Western blot using anti-eIF4E, anti-eIF4GI, and anti-4E-BP1 antibodies. Total= 1% of the input used for cap pull-down. (F-G) 4E-BP1 antagonizes eIF4E-eIF4GI association. (F) HeLa cells were transfected with either wild type (WT) HA-4E-BP1 or HA-4E-BP1-4A, or with HA-4E-BP1- Δ 4E for 48 h. Cells were lysed and then incubated with m7GTP-Sepharose beads. Eluted proteins were analysed by Western blot using specific antibodies. Total= 1% of the input used for cap pull-down. (G) HeLa cells were transfected with either wild type HA-4E-BP1 or with pcDNA. Cells were then left untreated, or were treated with arsenite (150 μ M) for 1h before being harvested and lysed to prepare cytoplasmic (C) and nuclear (N) fractions. Western blot analysis was performed to detect eIF4E and 4E-BP1 using specific antibodies. The anti-tubulin (cytoplasmic marker), -Histone3 (nuclear marker) antibodies were used to assess equal protein loading among cellular fractions.



Supplementary data 6. Depletion of eIF4GI impairs formation of SG. HeLa Cells were treated with non-specific or eIF4G-I-specific siRNAs for 96 h. Cells were treated with 150 μ M arsenite for 1 h. Cells were fixed, permeabilized and then processed for immunofluorescence to detect SG using anti-FMRP antibodies. Anti-eIF4GI antibodies were used to assess eIF4GI depletion. Circle denotes eIF4GI-depleted cells. Pictures were taken using a 63X objective with a 1.5 zoom. The percentage of cells harboring SG was calculated as described in Figure 2.



Supplementary data 7. PP242 sensitizes MCF-7 cells to Bortezomib-mediated apoptosis in vitro.

(A) MCF-7 cells were incubated with either pp242 (2.5 μ M), Bortezomib (2 μ M), or both compounds for 18 h. Cells were then lysed and proteins resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blot for p21 expression. Tubulin serves as a loading control and 4E-BP1 was used to verify mTORC1 inactivation with pp242. (B) qRT-PCR of p21 mRNA. Following treatment with Bortezomib (2 μ M), pp242 (2.5 μ M), or both, 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) Cells were treated as in (A), collected and 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.

Partie 2. Sorafenib et Lapatinib, deux agents chimiothérapeutiques capables d'induire la formation des granules de stress

Lorsque les cellules eucaryotes sont soumises à un stress (ex : radiations, drogues anti-cancers, stress thermique ou oxydatif), elles mettent en place des mécanismes de défense afin de s'adapter aux conditions extrêmes imposées, leur permettant de survivre. Une des premières réponses observables est l'inhibition de l'initiation de la traduction; généralement causée par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Cet évènement est aussi connu pour initier la formation de granules de stress (GS) sous certaines conditions de stress. Les GS sont des corps cytoplasmiques dynamiques et réversibles; servant de sites de stockage aux facteurs d'initiation de la traduction, aux ARNms, aux protéines de liaison à l'ARN et aux molécules de signalisation impliquées dans les voies de mort cellulaire. Le laboratoire a déjà montré que la formation des GS peut aussi se faire indépendamment de la phosphorylation du facteur eIF2 α ; impliquant l'inactivation de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction. Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence un nouveau rôle des facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF4GI dans la formation des GS induites par le traitement chimiothérapeutique de type Bortezomib. Ce rôle est stimulé par la voie oncogénique mTOR. De plus, notre étude a démontré que l'inhibition spécifique d'eIF4E ou l'inactivation de sa voie régulatrice mTOR empêche l'activation des voies anti-apoptotiques associées au GS, sensibilisant ainsi les cellules cancéreuses aux traitements.

Dans une étude pionnière, notre équipe a montré que le Bortezomib, un agent chimiothérapeutique utilisé pour le traitement de myélomes, induit la formation des GS. Cette formation des GS en condition de Bortezomib empêche la mort des cellules cancéreuses. Ces études ont donc établi la formation des GS comme un nouveau mécanisme potentiellement impliqué dans la chimiorésistance.

Néanmoins, le Bortezomib n'est pas la seule drogue anti-cancer capable d'induire la formation des GS (Morita et al, 2012). Par conséquent, nous avons mené le criblage d'une librairie de drogues anti-cancer afin de déterminer lesquelles seraient de potentielles inductrices de la formation des GS. Puis, nous avons commencé à étudier les mécanismes de formation de ces granules en supposant d'un rôle de la voie mTORC1-eIF4E dans le processus.

1. Criblage d'une librairie de drogues anti-cancer approuvées par le Food and Drug Administration

1.1. La Démarche expérimentale

Le National Cancer Institute nous a fourni 2 microplaques contenant des médicaments anticancéreux les plus récents approuvés par la FDA. La série actuelle (AODIII) se compose de 97 agents et a pour but de permettre la recherche sur le cancer, la découverte de médicaments et les études des combinaisons de médicaments dans le cadre de thérapie anti-cancer (Drug Synthesis and Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute). Les composés chimiothérapeutiques contenus dans ce set de plaque sont fournis à titre de 20 microlitres à une concentration de 10 mM dans 100% de DMSO. Tous les agents chimiothérapeutiques de cet ensemble ont été obtenus auprès de sources commerciales. En général, les substances ont été contrôlés à la fois par RMN et LC-MS.

Les 97 drogues anti-cancer sont référencées ci-après

http://dtp.nci.nih.gov/branches/dscb/oncology_drugset_explanation.html.

Celles-ci sont, dépendamment de leur identité, déjà utilisés dans le cadre de thérapies ou alors, elles sont en phase d'essai clinique.

Comme précédemment évoqué, il fut récemment mis en évidence que le Bortezomib n'était pas le seul agent anti-cancer capable d'induire la formation des GS. En effet, une étude menée chez la levure a démontré la capacité de la doxorubicin à promouvoir la formation des GS quand cette drogue est couplée à un choc thermique (Morita et al, 2012). Aussi, en 2011, Mason et al, ont suggéré que le Darinaparsin, actuellement en phase II d'un essai clinique pour son potentiel chimiothérapeutique, pouvait induire la formation de GS. Nous avons donc formulé l'hypothèse que parmi les 97 drogues anti-cancer, certaines d'entre elles seraient capable d'induire la formation des GS, dans le contexte de cellules cancéreuses résistantes.

La démarche expérimentale pour mener à bien cette investigation fut la suivante. Chaque drogue fut réaliquotée, diluée et amenée à la concentration optimale décidée pour les futures expériences. Aussi, nous avons décidé de travailler, dans un premier temps, avec les cellules cancéreuses fréquemment utilisées comme modèle de travail expérimental, nommément les HeLa (cancer du col de l'utérus) et les MCF7 (cancer du sein). Dépendamment des drogues chimiothérapeutiques identifiées comme inductrice de GS, nous viendrons à utiliser des modèles cellulaires cancéreux spécifiques et désignés comme étant le/les type(s) de cancer ciblé par l'agent chimiothérapeutique en question.

En parallèle, une revue de littérature sur chacune de ces drogues fut mené afin d'établir leur action potentielle dans la réponse cellulaire au stress et les concentrations à utiliser. Les critères de recherche se basaient sur l'état de phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction d'eIF2 α au sein des cellules traitées avec l'une des 97 agents chimiothérapeutiques ; sur l'implication de ces drogues dans des processus tels que l'inhibition de la traduction, le stress oxydant, les UVs, le stress du réticulum endoplasmique, la formation de granules

cytoplasmiques non identifiées ou les P-Bodies, la surexpression de facteurs de survie tels que p21 et impliqués dans la réponse au stress, la chimiorésistance ... etc. Bref, autant de critères simples qui nous ont permis de faire un classement initial de 10 drogues à fort potentielle d'induction des GS.

Parmi celles-ci, nous avons choisi de commencer en testant un set de 5 drogues. Il s'agissait du Sorafenib (Rahmani et al, 2007), Imatinib (Ferrandiz et al, 2010 ; Kusio-Kobalkia et al, 2012), Vorinostat (Peidis et al, 2010 ; Park et al, 2008), Celecoxib (Pyrko et al, 2008) et la Doxorubicin (Morita T et al, 2012).

Pour cela, nous avons travaillé avec 2 types de lignées cellulaires différentes. Ainsi, les cellules HeLa et MCF-7 ont été mises en culture au sein de plaques 6 puits puis traitées pendant différents temps avec les différentes drogues à la concentration adapté et prédéfini pour chacune de ces drogues. Les cellules ont ensuite été fixé puis analysé par immunofluorescence pour visualiser la formation de granules de stress, utilisant l'anticorps anti-FMRP et l'anticorps anti-G3BP1.

1.2. De nouvelles drogues chimiothérapeutiques capable d'induire la formation des GS

De cette première série d'analyse, Sorafenib et Celecoxib ont démontré leur capacité à induire la formation des GS au sein des cellules cancéreuses.

1.2.1. Le Sorafenib

Que ce soit dans les HeLa ou les MCF7, Sorafenib induit l'assemblage des GS (respectivement ~60% et ~90%) comme le manifeste la figure 1 suivante.

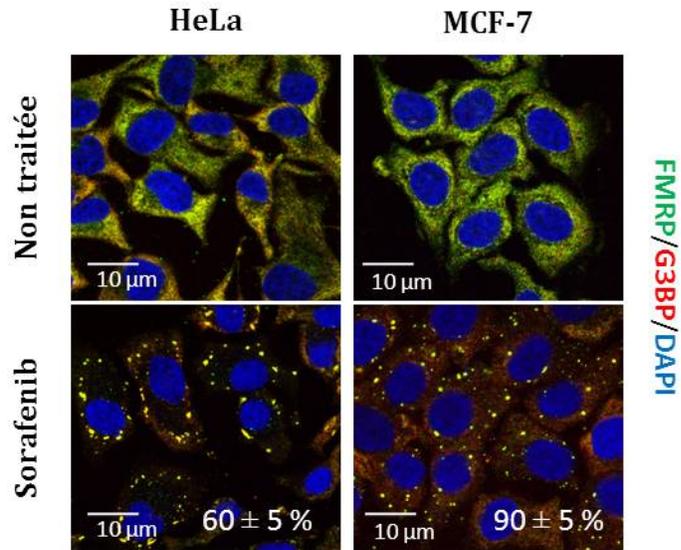


Figure 1. Sorafenib induit la formation des granules de stress au sein des HeLa et MCF-7. La lignée cellulaire indiquée fut traitée avec 50 μ M de Sorafenib pendant 2h, fixée puis analysée par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant les anticorps anti-FMRP et anti-G3BP. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss) à l'objectif 63X.

1.2.2. Le Celecoxib

Dans la même idéologie, Celecoxib induit aussi la formation des GS que ce soit dans les HeLa ou les MCF7 (respectivement \sim 80% et \sim 90%), comme le manifeste la figure 2 suivante.

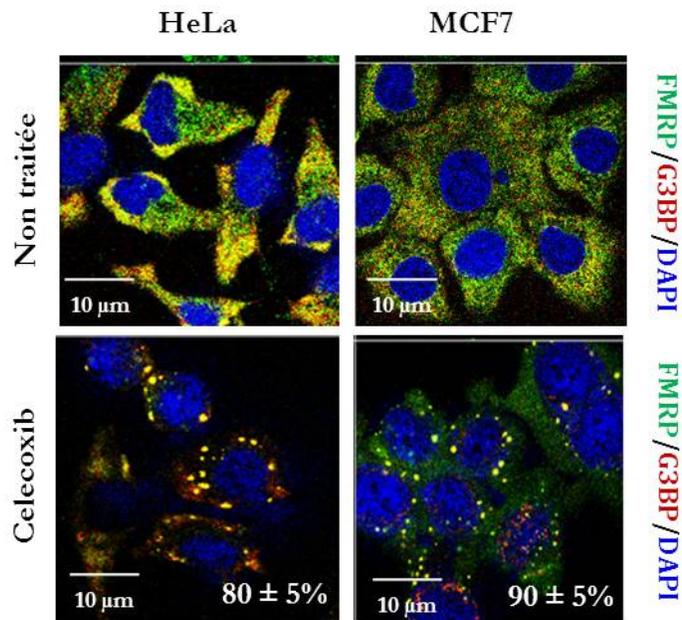


Figure 2. Celecoxib induit la formation des granules de stress au sein des HeLa et MCF-7. La lignée cellulaire indiquée fut traitée avec différentes drogues chimiothérapeutiques à 80μM pendant 4h et fixée puis analysée par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant l’anticorps anti-FMRP. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l’aide d’un microscope confocal (Zeiss) à l’objectif 63X.

1.2.3. Le Lapatinib

Ensuite, nous avons réalisé le criblage d’une librairie de 20 drogues chimiothérapeutiques supplémentaires. Parmi celles-ci, sont présentées à titre d’exemple, les observations obtenues pour les agents chimiothérapeutiques Erlotinib, Estramustine, Docetaxel et Lapatinib.

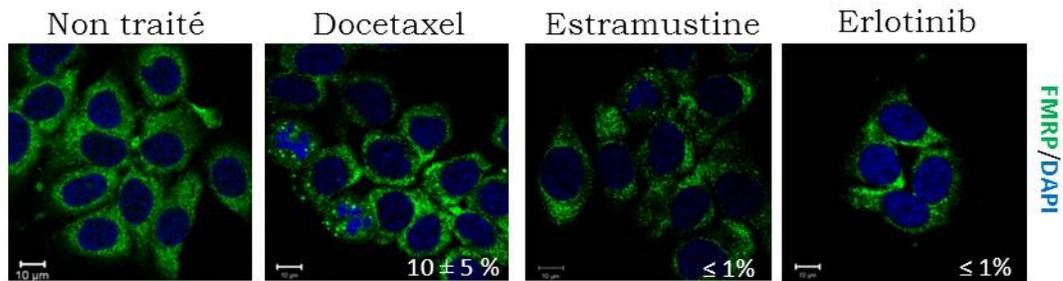


Figure 3. Observation de la formation des granules de stress au sein des MCF-7. La lignée cellulaire indiquée fut traitée avec différentes drogues chimiothérapeutiques à 25 μ M pendant 2h, fixée puis analysée par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant l'anticorps anti-FMRP. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss) à l'objectif 63X.

Parmi ces agents anti-cancer (Docetaxel, alcaloïde bloquant la mitose (Bissery et al, 1991); Estramustine, agent alkylant (Benson et Hartley-Asp., 1990) ; Erlotinib ; inhibiteur de tyrosine kinase (Bulgaru et al, 2003) et Lapatinib (inhibiteur de tyrosine kinase (Xia et al, 2002)), seul la drogue Lapatinib induit, de façon significative (\sim 50% chez les HeLa et \sim 80% chez les MCF7 Figure 4, 5 et données non présentées) , le formation des GS.

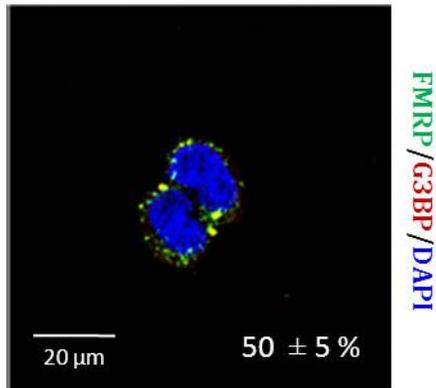


Figure 4. Lapatinib induit la formation des granules de stress dans la lignée cellulaire cancéreuse du col de l'Utérus HeLa. La lignée cellulaire indiquée fut traitée avec 25μM de Lapatinib pendant 2h, fixée puis analysée par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant les anticorps anti-FMRP et anti-G3BP. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss) à l'objectif 63X.

Au final, sur une librairie de 30 drogues à visée chimiothérapeutiques, 3 d'entre elles ont induit la formation de GS, selon nos conditions expérimentales. Nous ne négligeons pas le fait qu'en variant les conditions expérimentales (concentration, temps, lignées cellulaires, combinaison de drogues ...etc), nous pourrions découvrir, dans cette librairie, d'autres drogues capables d'induire l'assemblage des GS. Ainsi, en collaboration avec mes collègues Pauline Adjibade et Marie-Josée Fournier, nous avons poursuivi le criblage des 67 drogues restantes en révisant nos paramètres expérimentaux (Temps de traitement très bref (15 min, par exemple) à plus de 24h ; concentration faible (100nM, par exemple) ...etc).

Les résultats étant encore au stade préliminaire, nous ne les exposerons pas dans ce manuscrit de thèse.

Il faut noter qu'à l'issue de ce premier criblage, nous avons choisi de nous concentrer sur les agents Celecoxib et plus particulièrement sur les agents Sorafenib et Lapatinib qui, ainsi que vu dans les figures 1 et 4, peuvent induire la formation des GS.

2. Le Celecoxib induit la formation des GS et l'inhibition de la traduction

Le Celecoxib est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien de la famille des inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase-2. Il est essentiellement utilisé dans le traitement de l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde (McCormack P.I, 2011). Et des évidences démontrent une potentiel activité anti-tumorale de la part de ce composé (pour revue Jendrossek et al, 2013). Par ailleurs, des travaux ont montré une inhibition de la traduction et une augmentation du niveau de phosphorylation d'eIF2 α couplé à un stress du réticulum endoplasmique (Pyrko et al 2008) ; ce qui nous laisse supposer de sa capacité à induire la formation des GS (Figure 2).

Tel qu'attendu, la formation des GS dans les cellules HeLa ou MCF7 (Figure 2) corrèle avec une inhibition de l'initiation de la traduction telle que mesurée par extraction des polyribosomes sur gradient de sucrose (Figure 5), qui sont des évènements clés de la réponse cellulaire au stress.

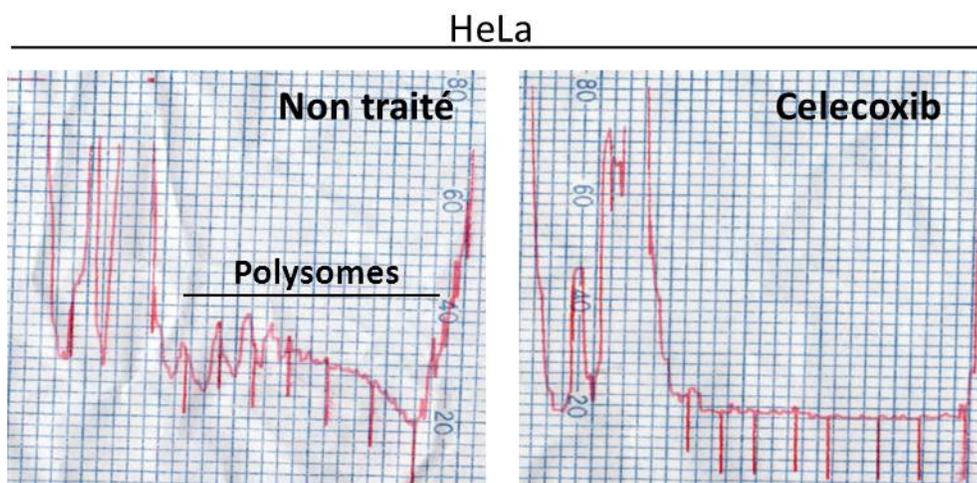


Figure 5. Celecoxib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction. Les cellules HeLa et MCF7 ont été traitées à raison de 80 μ M de Celecoxib pendant 4h. Les extraits cytoplasmiques furent sédimentés sur des gradients de sucrose linéaire 15-50%. Ces gradients de sucrose furent ensuite fractionnés via l'unité optique ISCO type muni du set de filtre 254 nm et 280 nm (Teledyne Isco).

Considéré dans leur ensemble, ces résultats montrent que le Celecoxib agit comme un inducteur de stress puissant capable d'induire la formation des GS. Néanmoins, le Celecoxib n'étant pas encore utilisé en clinique dans le cadre des thérapies anti-cancer (Winfield et Payton-Stewart., 2012), nous avons décidé de concentrer nos efforts sur les drogues Sorafenib et Lapatinib. En effet, notre but final étant de consolider le lien qui existe entre formation des GS et chimiorésistance.

3. L'agent chimiothérapeutique Sorafenib induit la formation des GS au sein des cellules d'hépatocarcinomes.

3.1. Assemblage des GS en réponse au Sorafenib

Le Sorafenib est couramment utilisé pour le traitement des cancers primitifs du foie et des reins. Ainsi qu'il l'a été décrit dans l'Introduction, cet agent est un inhibiteur de kinases multiples (Raf kinases, PDGFR, VEGFR) (Wilhelm et al, 2008).

Dans cette optique, nous avons d'abord évalué si Sorafenib pourrait induire la formation des GS au sein de modèle cellulaires cancéreux qui lui sont spécifiques. Nous avons donc choisi de travailler avec deux types de modèles : les cellules d'hépatocarcinomes qui sont sensibles au Sorafenib, les Huh7 et HepG2 (Hsu et al, 2012) et les cellules d'hépatocarcinomes qui sont résistantes au Sorafenib, Hep3B (Shen et al, 2013)

Comme nous l'avons vu précédemment, le Sorafenib induit efficacement la formation des GS dans les cellules HeLa et les MCF7, tel qu'évalué par immunofluorescence en utilisant différents marqueurs GS, FMRP et G3BP (Figure 1) Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules Hep3B et HepG2 issues d'hépatocarcinomes et les cellules PC3 (cancer de la prostate) (Figure 6 et données non présentées).

En revanche, les cellules Huh7 échouent à former des GS en réponse au Sorafenib (Figure 6) Ainsi, la formation des GS lors du traitement avec Sorafenib n'est pas limitée aux cellules HeLa et ne se produit pas dans toutes les cellules cancéreuses.

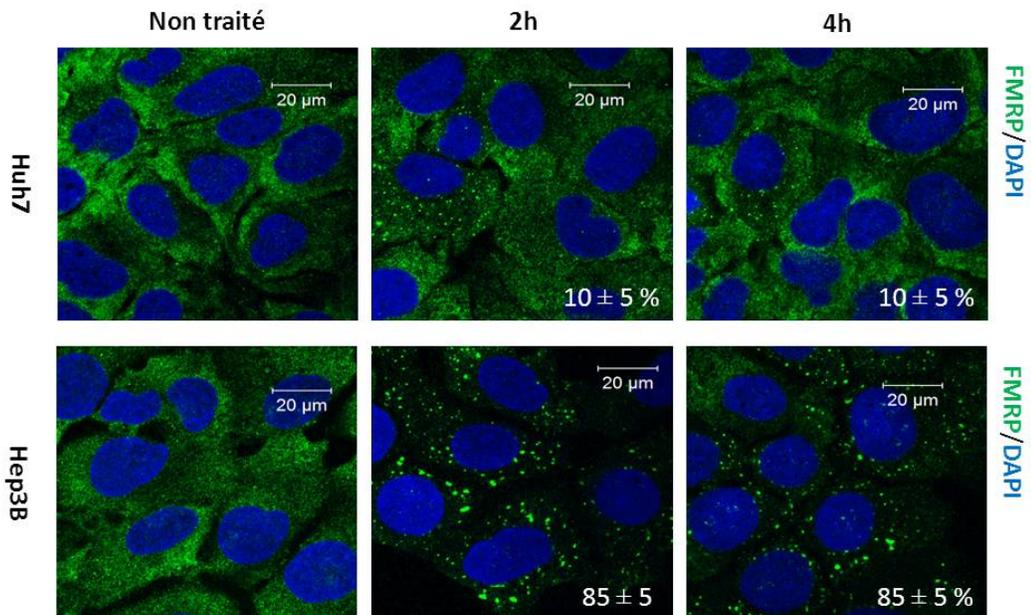


Figure 6. Observation de la formation des granules de stress dans les lignées cellulaires du cancer du foie (Huh7 et Hep3B). Les lignées cellulaires, issues d'hépatocarcinomes, furent traitées avec 10 μ M de Sorafenib pendant 2h, 4h ou 24h, fixées puis analysées par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant l'anticorps anti-FMRP, comme marqueur. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss) à l'objectif 63X.

3.2. Inhibition de l'initiation de la Traduction en réponse au Sorafenib

Tel qu'attendu, la formation des GS dans les cellules HeLa, MCF7 comme dans les cellules d'hépatocarcinomes corrèle avec une inhibition de l'initiation telle que mesurée par extraction des polyribosomes sur gradient de sucrose (Figure 7 et 8).

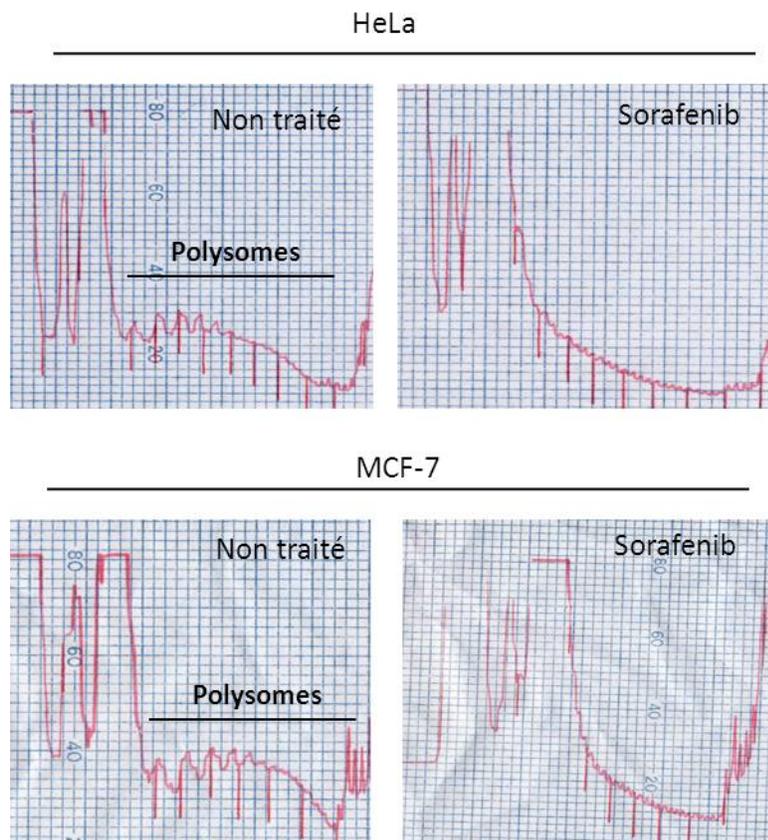


Figure 7. Sorafenib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction. Les cellules HeLa et MCF7 nt été traitées à raison de 50uM de Sorafenib pendant 4h. Les extraits cytoplasmiques furent sédimentés sur des gradients de sucrose

linéaire 15-50%. Ces gradients de sucrose furent ensuite fractionnés via l'unité optique ISCO type muni du set de filtre 254 nm et 280 nm (Teledyne Isco).

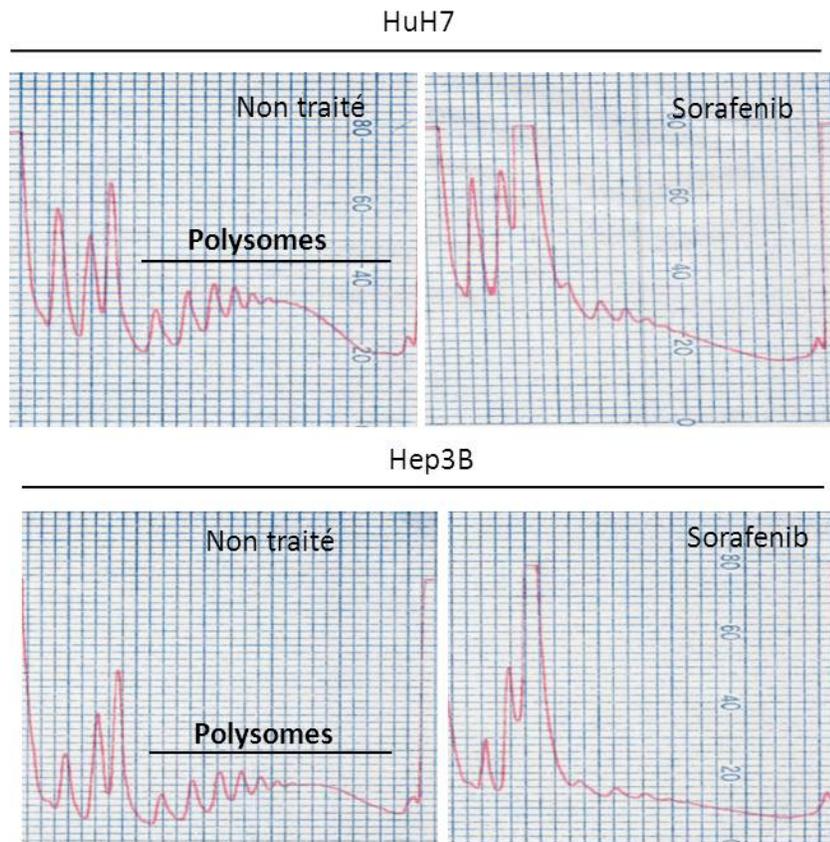


Figure 8. Sorafenib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction dans les cellules d'hépatocarcinomes. Les cellules HuH7, HepG2 et Hep3B ont été traitées à raison de 10uM de Sorafenib pendant 2h. Les extraits cytoplasmiques furent sédimentés sur des gradients de sucrose linéaire 15-50%. Ces gradients de sucrose furent ensuite fractionnés via l'unité optique ISCO type muni du set de filtre 254 nm et 280 nm (Teledyne Isco).

3.3. Mécanisme(s) de formation des GS induites par Sorafenib

D'autre part, nous sommes avons testé l'hypothèse que la voie oncogénique mTOR-eIF4E pourrait régir la formation des GS induites par Sorafenib. Dès lors, on constate que le l'inhibition pharmacologique de mTOR avec son inhibiteur spécifique PP242, aboutit à une réduction significative ($\sim 60\%$) de la formation des GS induites par Sorafenib, chez la lignée Hep3B (Figure 9). Par ailleurs, les travaux sont en cours pour définir le niveau d'implication de la voie de phosphorylation d'eIF2 α dans le processus de formation des GS induites par Sorafenib.

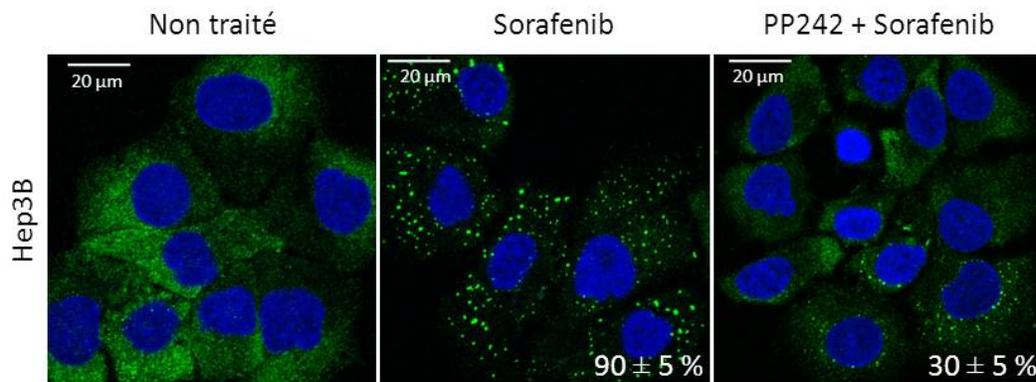


Figure 9. L'inhibition de mTOR par PP242 affecte la formation des GS induite par Sorafenib. Les cellules Hep3B ont été traitées on non avec 2.5 μM de PP242 pendant 5h puis traitées avec 10 μM Sorafenib pendant 2h. Les cellules ont ensuite été fixées puis analysées par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant l'anticorps anti-FMRP. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss) à l'objectif 63X. (Expérience réalisée par Marie-Josée Fournier)

Considérant l'ensemble de ces résultats, on peut supposer d'un rôle majeur de la voie mTOR-eIF4E dans la formation des GS induites par l'agent chimiothérapeutique Sorafenib. Néanmoins, nous ne négligeons pas le fait d'une intervention de la voie eIF2 α -phospho-dépendante dans l'assemblage des GS induites par Sorafenib.

3.4. La formation des GS s'associe à une résistance des cellules au Sorafenib

Curieusement, le désassemblage des GS n'est pas observé chez les cellules d'hépatocarcinomes Hep3B après l'addition prolongée de Sorafenib (Figure 8). Par ailleurs, cette absence de désassemblage des GS corrèle avec une difficulté des cellules à entrer en apoptose, tel qu'évalué par le manque d'activation, chez les cellules Hep3B et HepG2, de la caspase-3, principale effectrice de la voie de l'apoptose de type caspase-dépendante (Figure 10).

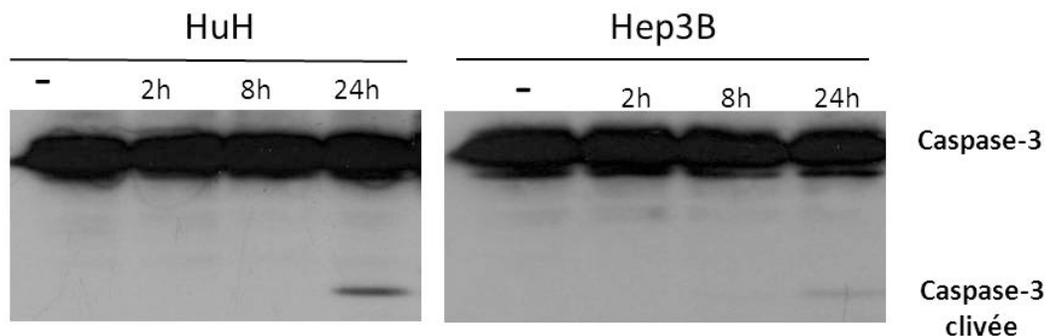


Figure 10. La formation des GS corrèle avec une résistance des cellules à l'Apoptose et un clivage faible de la caspase 3. La lignée cellulaire indiquée

fut traitée avec 10µM de Sorafenib pendant 24h. Des extraits protéiques ont été analysés par Western Blot en utilisant un anticorps contre Caspase-3. (Expérience réalisée par Marie-Josée Fournier)

Ce dernier résultat est corroboré par une analyse de mort cellulaire via un test d'Annexine V-FITC/PI, en condition de stress induit par un traitement prolongé au Sorafenib (Figure 11). D'ailleurs, comparativement aux cellules contrôles HuH7 qui ne forment pas de GS, les cellules Hep3B présentent un taux de mort cellulaire plus faible (~40% versus 70% pour les cellules Huh7 contrôles) dans le contexte d'un traitement prolongé au Sorafenib. Ceci corrèle, au même temps de traitement, avec une formation importante des GS (~75%) (données non montrées).

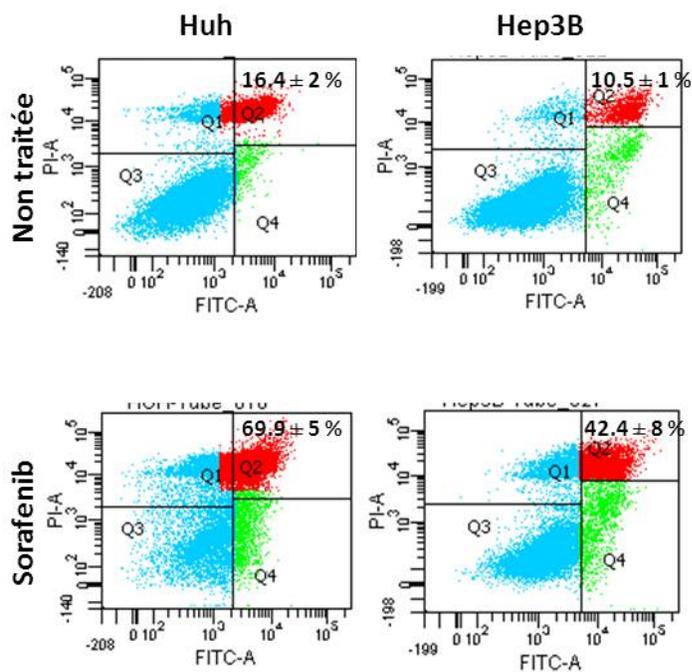


Figure 11. La formation des GS corrèle avec une résistance des cellules à l'Apoptose. La lignée cellulaire indiquée fut traitée avec 10µM de Sorafenib pendant 24h puis incubée avec de l'annexine V-FITC et du iodure de propidium (PI) et analysée par cytométrie de flux. Le pourcentage de mort total ou de

cellules mourantes a été défini comme la somme de l'apoptose précoce (en bas à droite) et l'apoptose tardive (en haut à droite).

Considérés dans leur ensemble, nos résultats indiquent que la résistance des cellules Hep3B à la mort cellulaire, est au moins en partie, médiée par la formation de GS induites suite à un traitement avec le Sorafenib. En parallèle de ce travail, nous continuons dans l'investigation de l'identification de des drogues anti-cancers capables d'induire la formation des GS. De plus, nous poursuivons l'étude des mécanismes de formation ces GS. Une fois la voie d'assemblage identifiée, nous testerons si l'inhibition de ces mécanismes de formation sensibilisera les cellules cancéreuses à la mort cellulaire.

En conclusion, Sorafenib induit des évènements qui sont caractéristiques d'une réponse cellulaire au stress. On peut donc classer cet agent chimiothérapeutique dans la catégorie des inducteurs de stress. Pour conclure sur cette section, nos premiers résultats montrent la capacité du Sorafenib à induire les GS. De plus, la voie mTOR-eIF4E semble être impliquée dans la formation des GS induite par Sorafenib. Enfin, considérées dans leur ensemble, nos données suggèrent un lien entre la formation des GS et la chimiorésistance des hépatocarcinomes observée lors de traitements avec Sorafenib

4. L'agent chimiothérapeutique Lapatinib induit la formation des GS

4.1. Assemblage des GS en réponse au Lapatinib

Nous avons ensuite concentré notre étude sur la Lapatinib (Tykerb/Tyverb), une drogue inhibitrice de tyrosine kinase et ciblant le récepteur ErbB2, membre de la famille des EGFR/E (Burriss., 2004) et approuvée pour les cancers du sein (Higa et Abraham, 2007).

Dans cette optique, nous avons d'abord évalué si Lapatinib pourrait induire la formation des GS au sein de modèles cellulaires cancéreux qui lui sont spécifiques. Nous avons donc choisi de travailler avec deux types de modèles : les cellules du cancer du sein qui sont sensibles au Lapatinib, les cellules triple-négatives (Foulkes et al, 2010) MDA-MB-231 (Nappi et al, 2012) et Hs578T (Hsia et al, 2013) et les cellules du cancer du sein qui sont résistantes au Lapatinib, les cellules ER (oestrogen-receptor)-positives MCF-7 et T47D (Konecny et al, 2006)

Comme nous l'avons vu précédemment, le Lapatinib induit efficacement la formation des GS dans les cellules HeLa et les MCF7, tel qu'évalué par immunofluorescence en utilisant différents marqueurs GS, FMRP et G3BP (Figure 12, panel 2). Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules du cancer du sein T47D.

En revanche, les cellules Hs578T et les MDA-MB-231 échouent à former des GS en réponse au Lapatinib (Figure 12, panel 1). Ainsi, la formation des GS lors du traitement avec Lapatinib n'est pas limitée aux cellules HeLa et ne se produit pas dans toutes les cellules cancéreuses.

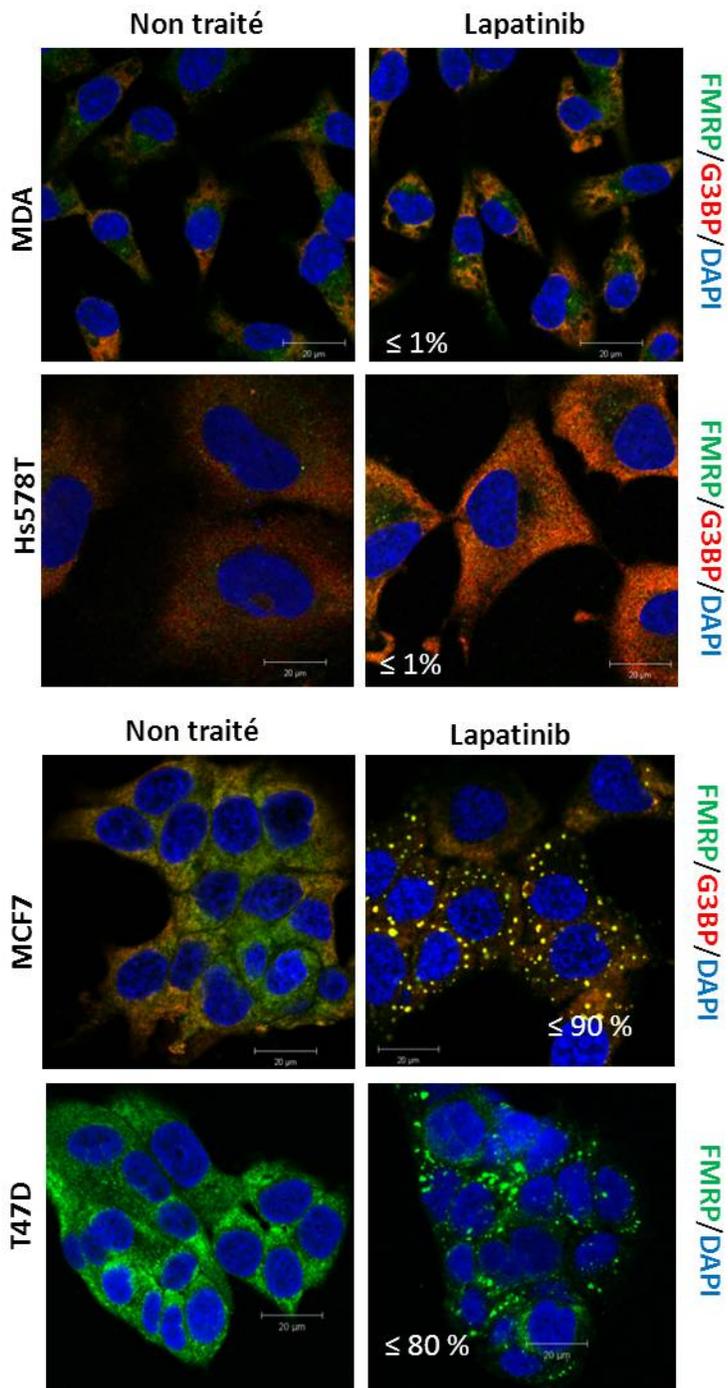
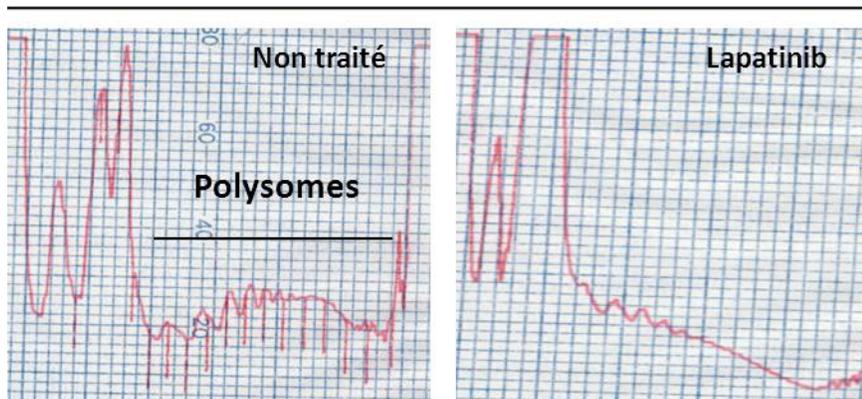


Figure 12. Lapatinib induit la formation des granules de stress dans les lignées cancéreuses du sein MCF7 et T47D résistantes au Lapatinib mais pas dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T sensibles à Lapatinib. La lignée cellulaire indiquée fut traitée avec 25µM de Lapatinib pendant 2h, fixée puis analysée par immunofluorescence pour visualiser les granules de stress, utilisant les anticorps anti-FMRP et anti-G3BP. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss) à l'objectif 63X.

4.2. Inhibition de l'initiation de la Traduction en réponse au Lapatinib

Tel qu'attendu, la formation des GS dans les cellules du cancer du sein MCF7 et T47D corrèle avec une inhibition de l'initiation de la traduction ainsi que mesuré par extraction des polyribosomes sur gradient de sucrose (Figure 13).

T47D



MCF7

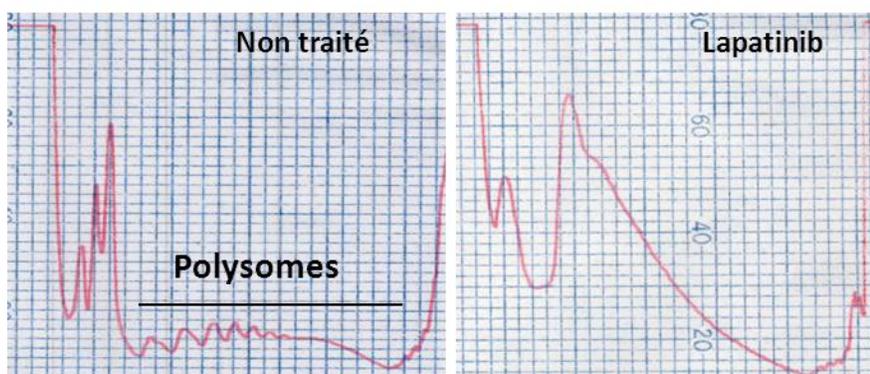


Figure 13. Lapatinib induit l'inhibition de l'initiation de la traduction. Les cellules T47D et MCF7 ont été traitées à raison de 20uM de Lapatinib pendant 2h. Les extraits cytoplasmiques furent sédimentés sur des gradients de sucrose linéaire 15-50%. Ces gradients de sucrose furent ensuite fractionnés via l'unité optique ISCO type muni du set de filtre 254 nm et 280 nm (Teledyne Isco).

4.3. Mécanisme(s) de formation des GS induites par Lapatinib

Les travaux sont en cours pour déterminer si la voie eIF2 α phospho-dépendante participe à la formation des GS. En parallèle, nous investiguons le rôle de voie de formation mTORC1-eIF4E dans l'assemblage des GS induites par le Lapatinib. Nous sommes présentement entrain de vérifier ces deux hypothèses. Les résultats étant au stade très préliminaire, ils ne seront pas abordés dans ce manuscrit.

4.4. La formation des GS s'associent à une résistance des cellules au Lapatinib

Dans cette étude, nous avons voulu vérifier si la formation des GS corrélait avec la résistance des cellules cancéreuses du sein suite au traitement avec Lapatinib. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des essais de mort cellulaire. Nous avons constaté que la formation des GS corrélait avec une difficulté des cellules à entrer en apoptose, tel qu'évalué par une analyse de mort cellulaire via un test d'Annexine V-FITC/PI, en condition de stress induit par un traitement prolongé au Lapatinib (Figure 14). D'ailleurs, comparativement aux cellules contrôles MDA-MB-231 et Hs578T qui ne forment pas de GS, les cellules MCF7 présentent un taux de mort cellulaire plus faible (~ 15% versus 70% pour les cellules Hs578T contrôles) dans le contexte d'un traitement prolongé à Lapatinib.

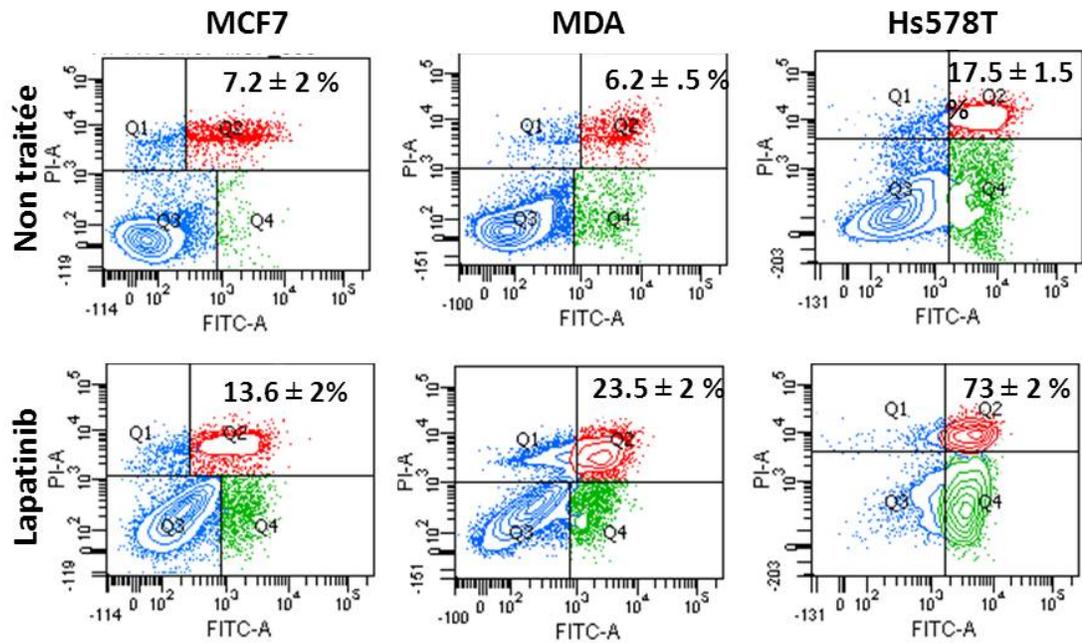


Figure 14 La formation des GS corrèle avec une résistance des cellules à l'Apoptose. Les cellules MCF7, MDA-MB-231 et Hs578T ont été traitées avec 25µM de Lapatinib pendant 24h puis incubée avec de l'annexine V-FITC et du iodure de propidium (PI) et analysée par cytométrie de flux. Le pourcentage de mort total ou de cellules mourantes a été défini comme la somme de l'apoptose précoce (en bas à droite) et l'apoptose tardive (en haut à droite).

Considérés dans leur ensemble, nos résultats indiquent que la résistance des cellules MCF7 à la mort cellulaire, est au moins en partie, médiée par la formation de GS induites suite à un traitement avec le Lapatinib.

En parallèle de ce travail, nous poursuivons l'étude des mécanismes de formation ces GS induites par Lapatinib. Une fois la voie d'assemblage identifiée, nous testerons si l'inhibition de ces mécanismes de formation sensibilisera les cellules cancéreuses du sein à la mort cellulaire.

Pour conclure sur cette section concernant le Lapatinib, nous avons donc observé la formation des GS chez les MCF-7 et T47D, lignées cellulaires du cancer du sein qui montrent une résistance à la mort cellulaire. Au contraire, les lignées Hs578T et MDA-MB-231, qui sont sensibles à Lapatinib, ne forment pas de GS lors du traitement avec cette drogue. De plus, nous devons confirmer que la voie mTOR-eIF4E est bien impliquée dans la formation des GS induite par Lapatinib.

Pour terminer ce chapitre, il est important de rappeler que deux nouveaux inducteurs de GS, Lapatinib et Sorafenib, ont été mis en évidence. Enfin, considérées dans leur ensemble, nos données suggèrent posent les bases solide d'un lien entre la formation des GS et la chimiorésistance des cellules du cancer du sein et du cancer du foie observé, respectivement lors de traitements avec Lapatinib et Sorafenib.

Partie 3. Rôle (s) de la kinase de stress HRI lors du fonctionnement cellulaire normal et lors de la réponse cellulaire au stress chimiothérapeutique

1. Contexte du Projet

HRI appartient à la famille des « eIF2 α kinases ». HRI intervient, entre autre, dans le contrôle l'initiation de la traduction en conditions de stress (Levin et al, 1976 ; Kramer et al, 1976). Plus récemment, notre laboratoire a démontré que le traitement avec le Bortezomib des cellules cancéreuses issues de tumeurs solides, induit une réponse de stress caractérisée par la phosphorylation du facteur d'initiation à la traduction eIF2 α . Cette phosphorylation est médiée par la kinase **HRI**. De plus, cette phosphorylation du facteur eIF2 α initie la formation des GS qui se trouvent être associée à une résistance des cellules cancéreuses au Bortezomib. Dans cette étude, il a été montré que la déplétion d'HRI entraînait une suppression des GS ; ce qui sensibilisait les cellules cancéreuses au traitement de Bortezomib (Fournier et al, 2010).

Ces résultats présupposent d'un nouveau rôle d'HRI dans la chimiorésistance.

Dans cette optique, j'ai débuté un projet connexe, en collaboration avec ma collègue Marie-Josée Fournier, visant à étudier le rôle de la kinase HRI dans les conditions de stress chimiothérapeutique induit par le Bortezomib.

1.1 Objectif de cette étude exploratoire

Il s'agit de comprendre la fonction de la protéine HRI dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes en condition de Bortezomib, induisant la formation des GS. Notre but, ici, étant d'investiguer le niveau d'implication d'HRI dans la réponse cellulaire face au stress mais aussi dans les conditions cellulaires physiologiques saines.

2. HRI, régulateur de l'expression génique en condition de stress chimiothérapeutique

2.1. Démarche expérimentale et analytique

➤ Intégrité des cellules HeLa shNE et shHRI

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'intégrité de nos cellules en s'assurant de leur aptitude à exprimer (cellules shNE) ou non (cellules shHRI), la kinase HRI. Les conditions expérimentales sont telles que chaque type cellulaires a été traité ou non pendant 4h à raison de 2 μ M de Bortezomib. Nos résultats préliminaires montrent une très faible expression non significative de la protéine HRI au sein des cellules.

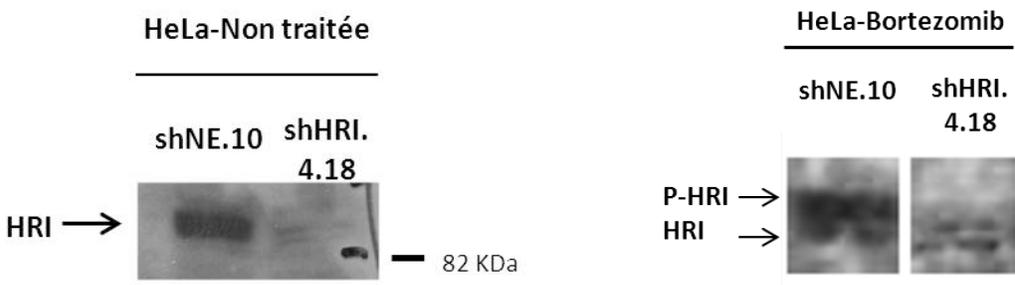


Figure 1. La déplétion d'HRI est effective au sein des cellules HeLa shHRI. L'analyse du niveau d'expression d'HRI dans les cellules HeLa shNE et shHRI non traitées et traitées avec 2 μ M de Bortezomib a été analysé par western blot, en utilisant un anticorps spécifique ciblant la protéine HRI. Après criblage d'une librairie de clones, ce sont les clones shNE.10 et shHRI 4.18 qui ont démontré, respectivement la meilleure expression et déplétion d'HRI, et qui ont été utilisés pour les expériences. P-HRI : état phosphorylé d'HRI. (Adapté du Mémoire de Maîtrise « Rôles et implications de la protéine HRI dans la réponse cellulaire face au stress », Martel D., 2013)

➤ **Profil traductionnel des cellules HeLa shNE et shHRI**

En parallèle, nous nous sommes posé la question de savoir si la traduction générale était affectée par la déplétion d'HRI. Dans cette optique, nous avons analysé l'état traductionnel de la cellule en utilisant la méthode d'extraction des polyribosomes sur gradient du sucrose.

Nous constatons que la déplétion d'HRI n'a pas d'effet majeur sur l'activité traductionnelle de la cellule (Figure 2).

Cependant, ces premiers résultats demandent à être confirmés par le biais d'expériences complémentaires qui seront réalisées au sein des différents clones des lignées HeLa shHRI et HeLa shNE. De plus, nous mènerons des expériences d'ARN interférence ciblant HRI, afin de corroborer les résultats obtenus dans les lignées stables; et ce, en condition de stress chimiothérapeutique. Enfin, nous validerons ces résultats préliminaires par des expériences d'incorporation de méthionine S³⁵.

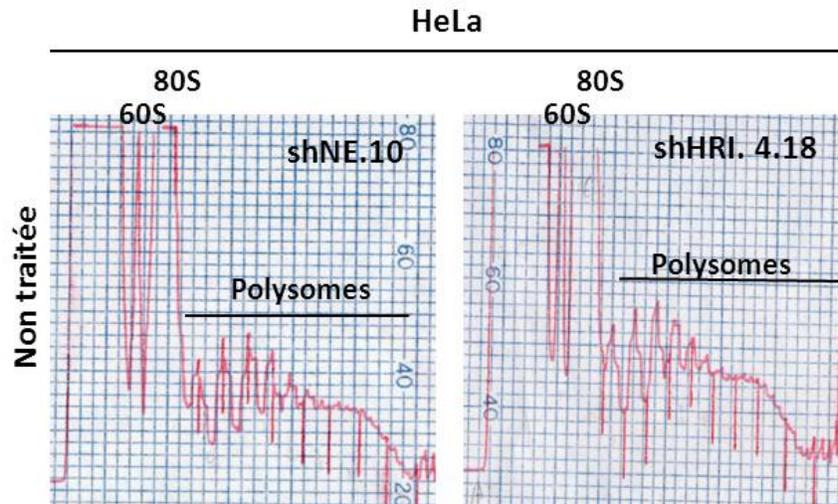


Figure 2. La déplétion d’HRI n’a pas d’effet majeur sur l’initiation de la traduction. Les extraits cytoplasmiques, issus des cellules cancéreuses HeLa shNE et HeLa shHRI, furent sédimentés sur des gradients de sucrose linéaire 15-50%. Ces gradients de sucrose furent ensuite fractionnés via l’unité optique ISCO type muni du set de filtre 254 nm et 280 nm (Teledyne Isco).

➤ **Analyse par microarray**

Dans un second temps, **l’ARN total** a été isolé de ces lignées cellulaires HeLa exprimant de façon stable ou non le small hairpin dirigé contre l’ARNm d’HRI.

Puis, les **ARNs** de chaque groupes expérimentaux ont été comparé avec la technologie du microarray (ou Puce à ADN). Nous avons 4 conditions au total : les cellules shNon Effectrices non traitées, les cellules shNon Effectrices traitées avec Bortezomib, les cellules shHRI non traitées et les cellules shHRI traitées avec Bortezomib. Cette analyse a été reproduite en triplicat pour chaque condition.

Ensuite, par l'intermédiaire de la technique de **SAM analysis** ou Significance Analysis of Microarrays, nous avons sélectionné tous les gènes régulés de façon significative dans les conditions traitées et non traitées au Bortezomib.

Dans le contexte de **gènes sous-exprimés**, nos critères de sélection se sont basés sur un Fold-Change inférieur à 0.5 et un p-value inférieur à 0.001.

Dans le contexte de **gènes sur-exprimés**, nos critères de sélection se sont basés sur un Fold-Change inférieur à 2.1 et un p-value inférieur à 0.001.

L'analyse globale de ce microarray manifeste, pour chaque condition, des signatures moléculaires spécifiques par rapport à l'expression globale des gènes. Par ailleurs, on remarque que les résultats bruts de ces microarrays corroborent les données préliminaires obtenues sur l'état traductionnel de la cellule, en absence d'HRI. En effet, ce n'est qu'un seul un set de gènes particuliers est régulé par la kinase HRI.

Et plus précisément, on observe une discrimination d'expression de certaines familles de gènes entre les cellules non traitées et les cellules soumises au stress chimiothérapeutique de type Bortezomib.

➤ **Validation des résultats de microarray par qRT-PCR**

Pour valider les changements dans les niveaux d'expression des transcrits d'ARN issus des gènes identifiés par le microarray, nous avons sélectionné dans les conditions non traitées et traitées au Bortezomib, des séries de 15 à 20 gènes significativement régulés. Ensuite, nous avons réalisé des qRT-PCR pour valider le niveau d'expression de ces groupes de gènes. Chaque gène retenu, ici, est associé à une ou plusieurs des fonctions cellulaires citées ci-après : la réponse au

stress, la prolifération cellulaire, l'oncogenèse, la signalisation cellulaire, l'apoptose, la transcription, la traduction, la survie cellulaire, la réparation de l'ADN, le métabolisme de l'ARN ou de l'ADN et le cycle cellulaire.

Un exemple d'analyse par qRT-PCR est présenté dans la figure qui suit.

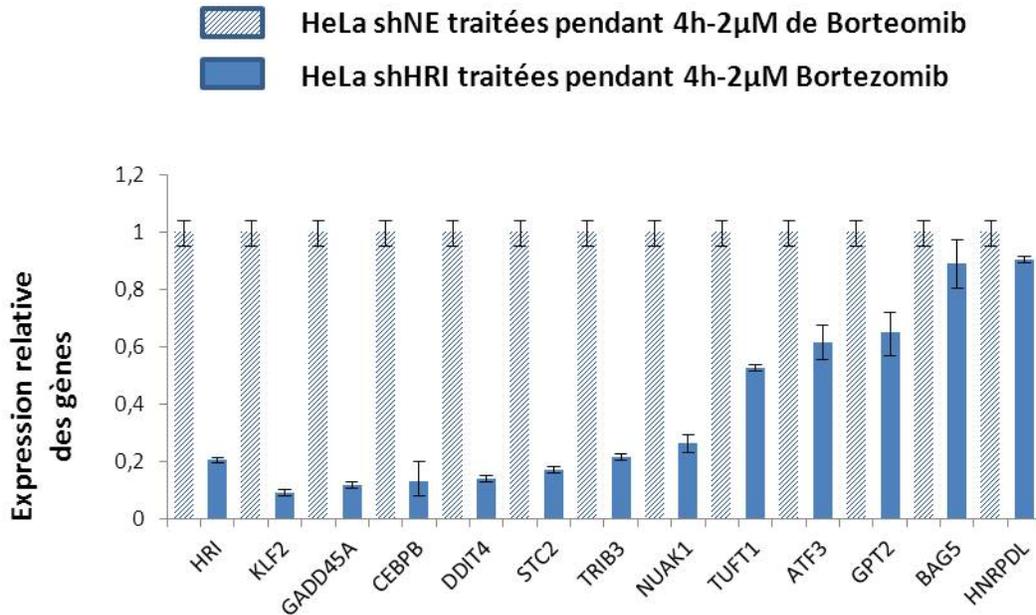


Figure 3. Exemple de validation du microarray par q-RT-PCR. Les cellules HeLa shNE et shHRI ont été traitées avec 2µM de Bortezomib pendant 4h. Le niveau relative d'expression des différents gènes tels que HRI (contrôle), KLF2, GADD45A, CEBPB, DDIT4, STC2, TRIB, NUA1, TUFT1, ATF3, GPT2, BAG5 et HNRPD a été déterminé et normalisé (à l'aide du gène de ménage GAPDH) par qRT-PCR. Ces gènes font partie du groupe de gènes sous-régulés dans les cellules stressées et dénuées en HRI versus les cellules contrôles NE stressées surexprimant ces mêmes gènes.

2.2. Profils d'expression génique dans les HeLa shNE et shHRI soumises au Bortezomib

2.2.1. Les conditions expérimentales

Les différentes listes de gènes identifiées par SAM analysis des cellules traitées avec Bortezomib (versus les groupes contrôles) ont été analysées pour déterminer les groupes de gènes qui sont sous-exprimés et surexprimés en condition de stress chimiothérapeutique.

Ces analyses ont été réalisées pour la condition :

- HeLa shNE non traitées versus HeLa shHRI traitées avec Bortezomib ;
- HeLa shNE non traitées versus HeLa shNE traitées avec Bortezomib;
- HeLa shHRI non traitées versus HeLa shHRI traitées avec Bortezomib.
- HeLa shNE non traitées versus HeLa shHRI non traitées; et ce, afin de découvrir un rôle nouveau d'HRI dans les cellules dénuées de stress.

2.2.2. Résultats bruts

Les cellules shNE traitées avec Bortezomib (vs. shNE non traitées) présentent 52 gènes sous-exprimés et 68 gènes sur-exprimés (Tableaux 1 et 2 situés en Annexes).

Les cellules shHRI traitées avec Bortezomib (vs. shHRI non traitées) présentent 33 gènes sous-exprimés et 139 gènes sur-exprimés (Tableaux 3 et 4 situés en Annexes).

Les cellules shHRI traitées avec Bortezomib (vs. Groupe de **gènes sur-exprimés** au sein des shNE non traitées) présentent 238 gènes sous-exprimés (Tableaux 5 situés en Annexes).

Les cellules HeLa shHRI non traitées (vs. shNE non traitées) présentent 80 gènes sous-exprimés et 64 gènes sur-exprimés (Tableaux 6 et 7 situés en Annexes).

2.2.3. Ontologie des gènes issus du microarray : vue globale

Le procédé de Gene Ontology a été utilisé pour explorer les propriétés fonctionnelles spécifiques des signatures moléculaires de chaque groupe de gènes évoqués précédemment dans les sections ci-dessus. Seules les fonctions biologiques reliées à notre thématique de recherche, ont été retenues lors de cette analyse ontologique.

2.3. HRI régule l'expression de gènes lors de la réponse au stress induite par le Bortezomib

2.3.1. Ontologie des gènes de la condition contrôle « HeLa shNE – non traitée vs. HeLa shNE – Bortezomib »

L'analyse du groupe de gènes de cette condition 'contrôle' indique une surexpression des gènes de la famille de HSP (heat shock protein) tels que

HSP70, HSPA1B, HSPH ...etc mais aussi des facteurs de stress tels que HERPUD1 qui sont manifeste d'une réponse au stress et d'une régulation négative de l'apoptose (HERPUD1).

De plus, on constate une surexpression de facteurs de survie tels que p21 (CDKNA1). Ceci corrobore les résultats exposés dans le chapitre 1 des Résultats et les travaux de Mazroui et al, 2007 et Gareau et al, 2011. En effet, ces travaux démontrant que l'exposition prolongée des cellules à un inhibiteur du protéasome tel que le Bortezomib, entraîne une stabilisation et donc surexpression de p21, par le biais des GS. On retrouve aussi des facteurs régulant la croissance et prolifération cellulaire (GADD45A, DDIT3, DDIT4, GDF15...). Aussi, la surexpression d'oncogènes tels que JUN est observé. De même, l'expression de nombreux facteurs de transcription tels que XBP1 et ATF3 est observée ainsi que celle des membres de la famille du Tumor Necrosis Factor.

Les gènes sous-régulés, en condition de Bortezomib, appartiennent essentiellement aux familles des inhibiteurs du cycle cellulaire (CCNB1, PSRC, SKP2, CDKN3.)

Collectivement, ces données suggèrent que les cellules cancéreuses soumises au Bortezomib sont dans la phase de réponse au stress chimiothérapeutique induisant la formation de GS « protectrices ».

2.3.2. Ontologie des gènes de la condition « HeLa shHRI - non traitée vs. HeLa shHRI – Bortezomib »

Dans le contexte d'une déplétion d'HRI au sein de cellules cancéreuses, l'analyse du groupe de gènes contrôle HeLa shHRI non traitées versus HeLa shHRI traitées

avec Bortezomib, indique une surexpression des gènes de la famille des modulateurs du cycle cellulaire tels que CDKN1A, encore appelé p21. Plus précisément, on retrouve aussi des inhibiteurs de prolifération cellulaire impliquant l'arrêt du cycle en phase G2/M (IER5). On constate aussi la surexpression de facteurs tels que NFKB1 qui, de façon indirecte (en passant par NFkB), inhibe le rétrocontrôle négatif de l'apoptose. Mais aussi, sont surexprimés des facteurs médiant positivement l'apoptose tels que BCL2 ou BID.

Bien sûr, nous observons la surexpression des membres de la famille des heat shock protein, des facteurs de stress tels que HSP70; indiquant que les cellules sont entrain de répondre à un stress.

De plus, nous constatons que des facteurs de transcription sont, ici, sur-régulés (ATF3, XBP1 ...)

On observe aussi la sous-régulation de gènes appartenant aux cascades de signalisation impliqués dans la modulation du cycle cellulaire (E2F2, PSRC1, FBXO5...) et des protéines impliquées dans la survie cellulaire, croissance cellulaire et progression tumorale (FAST, GAS1, WNT5A ...)

Considéré dans leur ensemble, ces données suggèrent qu'en absence d'HRI et soumise au Bortezomib, la cellule cancéreuse régule négativement sa division cellulaire, sa croissance et active son entrée en apoptose. Ceci est soutenu par les travaux menés au laboratoire et qui sont résumés dans l'étude de Fournier et al, 2010.

2.3.3. Cas de figure particulier avec la condition expérimentale « HeLa shNE - Bortezomib vs. HeLa shHRI – Bortezomib »

➤ Contexte de l'analyse

Une précédente étude menée au laboratoire démontre une surexpression du facteur de survie p21 dans les cellules soumises au traitement avec Bortezomib (Gareau et al, 2011). Ce même inducteur de stress est capable d'induire la formation de GS dont l'assemblage dépend de la kinase HRI (Fournier et al, 2010).

C'est pour comprendre le rôle d'HRI lors d'un stress chimiothérapeutique que nous avons comparé la population de gènes qui étaient surexprimés par les cellules HeLa shNE traitées avec Bortezomib aux groupes de gènes qui est sous-exprimés par les cellules HeLa shHRI traitées avec Bortezomib.

En effet, nous émettons l'hypothèse que, dans de telles conditions, les ARNms que nous retrouverons sous-régulés dans les cellules dénuées d'HRI, seront les ARNms qui sont normalement protégés et stabilisés dans les GS induites par Bortezomib dans les cellules shNE exprimant toujours HRI. Cependant, nous ne négligeons pas le fait qu'HRI puisse intervenir dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de ces gènes par un autre biais que celui des GS.

➤ **Ontologie des gènes**

L'ontologie des **gènes sous-exprimés** par les cellules déplétées en HRI traitées avec Bortezomib et comparativement aux cellules non traitées exprimant encore HRI, montre l'altération de quatre voies de signalisation principales.

1- Nous retrouvons, en grand nombre, des gènes appartenant à la famille des facteurs de transcription (KLF2, MKX, NUPR1, GTF2F2, TCEB3, ...). On peut

supposer qu'au sein de cellules exprimant toujours HRI, cette dernière jouerait un rôle au niveau transcriptionnelle en modulant l'expression de facteurs de transcription médiant la réponse au stress.

2- Nous observons la sous-expression de facteurs modulant la croissance et prolifération cellulaire (BMP4, GADD45A, BCAT1, TGFB1, CTGF, IGFBP3, TLN1...).

3- De nombreux gènes impliqués dans la carcinogenèse et sont aussi sous-exprimés (BCAT1, CPA4, MUC1, CAV1, JUN, BARD1, HIF1A, P8, LYPD1...).

4- Nous constatons aussi la sous-expression de gènes appartenant à la voie de l'apoptose (TRAF5) mais aussi des facteurs de survie tels que NFkB1 ou FOXO3.

Collectivement, ces observations suggèrent qu'en condition de stress chimiothérapeutique et en absence d'HRI, la progression tumorale de la cellule cancéreuse est altérée par la modulation, au niveau transcriptionnelle, de sa capacité à croître, proliférer et survivre.

3. HRI, régulateur de l'expression des gènes en condition cellulaire dénuée de stress

3.1. Contexte de la recherche

Notre connaissance de la littérature concernant la protéine HRI nous permet de constater que seul un rôle dans la réponse au stress lui est attribué. Dans cet état d'esprit, nous avons cherché à comprendre sa fonction au sein de la cellule dénuée de stress.

Pour cela, nous avons réalisé un microarray en comparant les cellules HeLa shNE versus HeLa shHRI, en condition non traitée. Nous avons donc réalisé des qRT-PCR pour valider le niveau d'expression de ces gènes.

3.2. Ontologie des gènes

Dans la condition expérimentale HeLa shNE non traitée versus HeLa shHRI non traitée, plusieurs cascades de signalisation sont affectées par l'absence d'HRI.

La famille de gènes qui est majoritairement sous-exprimée est composée de facteurs de croissance et prolifération cellulaire (BMP4, IGFBP3, SERPINE1, FGF2, PDGFC...).

Nous observons aussi la sous-expression de gènes impliqués dans les fonctions apoptotiques de la cellule (BIRC3, TRAF5...) et l'Oncogenèse (LYPD1, TACSTD2, GLIPR1, TNFRSF21...).

Par contre, l'absence d'HRI provoque la surexpression de populations de gènes impliquées, en majorité, dans la transcription (FOXQ1, HOXA10, TCEAL1, TAF15).

Peu de gènes associés au processus de traduction (EEF1A2) sont surexprimés. Néanmoins, des gènes impliqués dans l'oncogenèse sont aussi surexprimés en nombre important (FOLR1, MAGE1, BCAS4, FRAT2...).

Considérés dans leur ensemble, ces résultats suggèrent qu'au sein d'une cellule cancéreuse n'exprimant pas HRI, la croissance de la cellule est altérée de façon importante. Cependant, son phénotype cancéreux ne semble pas affecté.

Au final, ces données préliminaires nous permettent de postuler d'un rôle de régulateur positif d'HRI sur la croissance et prolifération d'une cellule cancéreuse. De plus, HRI agirait sur ce processus par le biais d'une régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la morphologie, taille et croissance de la cellule cancéreuse.

3.3. En conclusion

Ultimement, afin d'asseoir un rôle d'HRI au sein des cellules cancéreuses, en période de stress chimiothérapeutique, il est nécessaire de reproduire ces expériences (essais in ovo, validation par qRT-PCR du micro-array, détermination de la taille des cellules déplétées en HRI) au sein des différents clones des lignées HeLa shHRI et HeLa shNE. De plus, nous mènerons des expériences d'ARN interférence ciblant HRI, afin de corroborer les résultats obtenus dans les lignées stables.

4. HRI est impliquée dans la croissance cellulaire

4.1. Contexte de la recherche

Des résultats obtenus par mon collègue David Martel, ont mis en évidence une morphologie cellulaire ainsi qu'un taux de croissance différents des cellules HeLa shHRI en condition non traitée, comparativement aux contrôles HeLa shNE. En effet, il a été montré que l'injection sur la membrane chorio-allantoïdienne d'un foetus de poulet (in ovo) de cellules cancéreuses déplétées en HRI inhibe le développement de la tumeur. Inversement, on observe la formation d'une masse

apparente pour les cellules HeLa contrôles non effectrices et ce, toujours en condition non traitée. Ceci suggère donc un rôle de HRI dans la croissance tumorale (données non montrées dans ce manuscrit mais retrouvées dans le mémoire de maîtrise «Rôles et implications de la protéine HRI dans la réponse cellulaire face au stress » de David Martel, 2013).

Dans cet état d'esprit, et basé sur les résultats de mon collègue David Martel, sur les données du microarray évoquées dans la section 2 et 3 montrant que la déplétion d'HRI affectait des familles de gènes liées à la croissance/prolifération cellulaire (BMP4, GADD45A, BCAT1, TGFB1, CTGF, IGFBP3, TLN1...), nous avons testé l'hypothèse que HRI pourrait réguler la taille des cellules, ici, dénuées de stress.

4.2. La démarche expérimentale

La cytométrie en flux (FACS) est un outil d'analyse automatique rapide, puissant, sûr et permettant d'identifier les caractéristiques des cellules. Il permet d'analyser des paramètres sur la cellule vivante et des perspectives immenses s'ouvrent lorsque les cellules sont marquées spécifiquement. Le cytomètre comporte une chambre de lecture éclairée par un rayon laser devant lequel les cellules passent une à une. Deux paramètres sont mesurables directement, sans marquage cellulaire :

- la **taille de la cellule** : plus la cellule est grosse, plus la diffusion du rayon, dans son axe, est grande (diffusion axiale ou **FSC**) ainsi que le montre la figure 4 suivante.

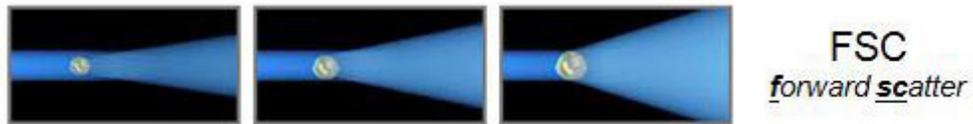


Figure 4. Mesure du Forward Scatter d'une cellule par cytométrie en flux.
 (Adapté de www2.ac-lyon.fr)

- Et sa **granularité** : plus la cellule est granuleuse, plus la diffraction du rayon observée latéralement est grande (diffusion latérale ou **SSC**) ainsi que le montre la figure 5 suivante.

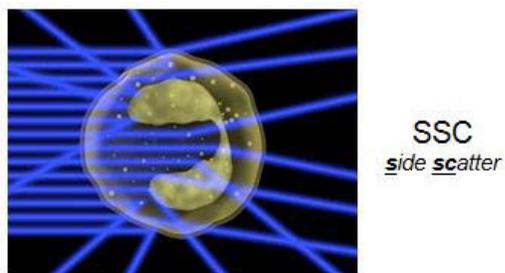


Figure 5. Mesure du Side Scatter d'une cellule par cytométrie en flux.
 (Adapté de www2.ac-lyon.fr)

L'afficheur numérique des résultats produit un graphique avec SSC en ordonnées et FSC en abscisses (Figure 6). L'analyse d'un échantillon porte en général sur un nombre de cellules allant de 10000 à 100000. Chaque point sur le diagramme correspond aux caractéristiques d'une seule cellule. Dans nos conditions expérimentales, nous avons compté 20 000 événements dans 2 triplicatas différents.

Nous avons donc basé nos investigations quant au rôle de HRI dans la croissance et taille cellulaire, sur cette technique particulière de détermination de la taille des cellules par cytométrie en flux (utilisée dans les travaux de Fingar et al, 2002).

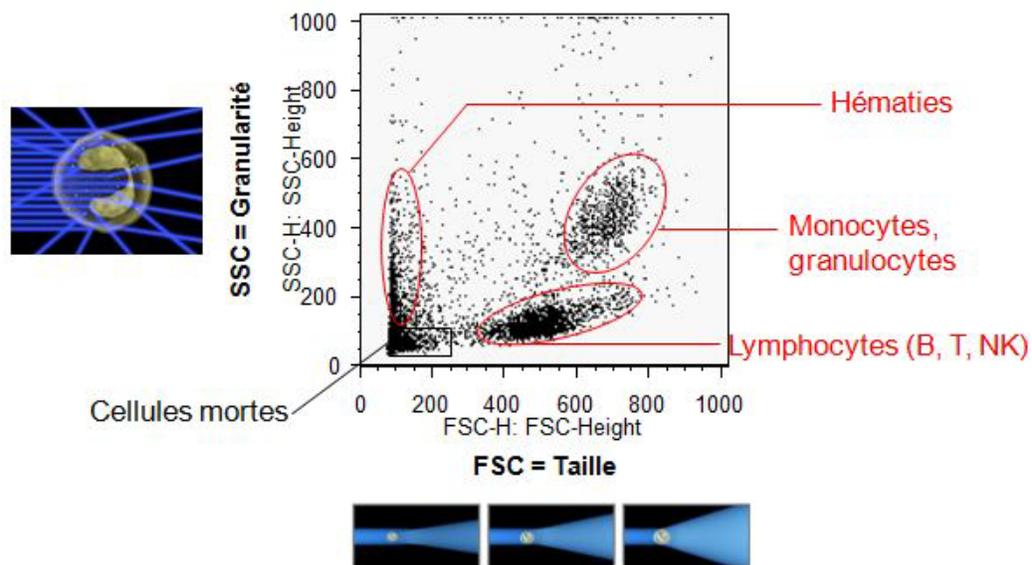


Figure 6. Analyse de la taille des cellules du sang. Le Diagramme ci-contre a été obtenu avec un échantillon de sang : FSC faible : petites cellules -> des hématies; FSC grand et SSC faible : cellules plus grosses, peu granuleuses -> des lymphocytes FSC grand et SSC grand : grosses cellules, granuleuses -> des granulocytes. (Adapté de www2.ac-lyon.fr)

4.3. Rôle potentiel d'HRI dans la régulation de la taille des cellules cancéreuses

Pour cela, nous avons mesuré la taille des cellules HeLa shNE et HeLa shHRI par cytométrie en flux (Fingar et al, 2002). Nous constatons que les valeurs des paramètres FSC et SSC caractéristiques des cellules HeLa shNE sont significativement supérieures à ceux des HeLa shHRI. En effet, les shNE présentent une FSC de 80% et une SSC de 61% contre une FSC de 58% et une SSC de 50% pour les shHRI (Figure 7). En conclusion, nos résultats préliminaires indiquent que la déplétion d'HRI affecterait négativement la croissance et taille

des cellules cancéreuses. Néanmoins, il est nécessaire de confirmer ces résultats le biais d'expériences complémentaires qui pourraient utiliser la méthode de « cell size determination » décrite dans les travaux de Dowling et collaborateurs en 2010.

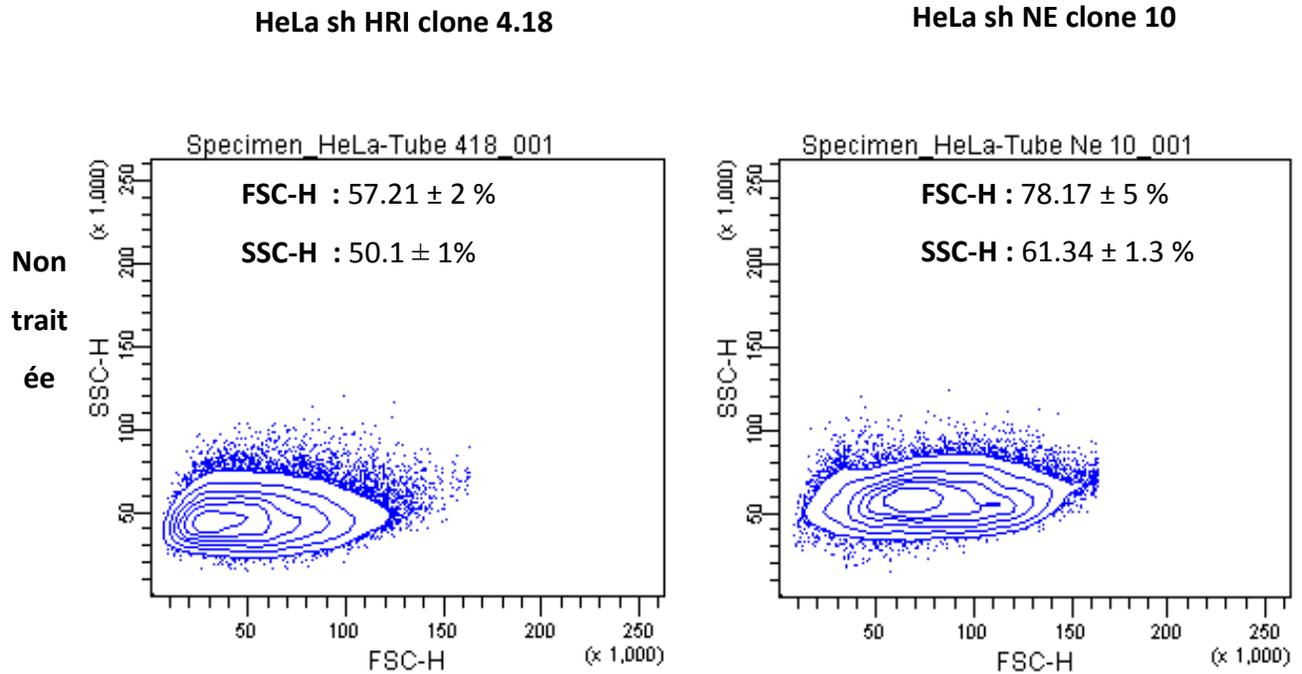


Figure 7. Analyse de la taille des cellules HeLa déplétées en HRI. Des cellules HeLa shRNA non effectrices (clone 10) et shRNA ciblant HRI (clone 4.18) ont été mise en culture, trypsinisées, délicatement lavées puis resuspendues avec du PBS 1X et analysées par cytométrie en flux. **FSC** ou taille de la cellule. **SSC** ou Granulosité des cellules.

On peut donc supposer qu'en condition cellulaire normale, HRI participe à la régulation positive de la croissance et taille des cellules cancéreuses. A date, nous ne connaissons pas de rôle d'HRI dans les cellules non-érythroïdes dénuées de stress. D'où notre intérêt pour cet axe de recherche novateur. C'est un nouveau rôle qui est ainsi mis en évidence pour la kinase HRI. Dans de futures expériences, nous tenterons de déterminer le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) emprunté(s) par HRI pour réguler la taille des cellules cancéreuses dénuées de stress.

Ultimement, afin d'asseoir un rôle d'HRI dans les cellules cancéreuses dénuées de stress, il sera nécessaire de reproduire ces expériences (essais *in ovo*, validation par qRT-PCR du micro-array, détermination de la taille des cellules déplétées en HRI) au sein des différents clones des lignées HeLa shHRI et HeLa shNE. De plus, nous mènerons des expériences d'ARN interférence ciblant HRI, afin de corroborer les résultats obtenus dans les lignées stables.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence plusieurs faits qui se recoupent et qui sont : un nouveau mécanisme de formation des GS et qui repose sur l'activité de mTORC1 ; nous avons découvert, parmi les agents chimiothérapeutiques approuvés par le Food and Drug Administration, de nouveaux inducteurs des GS ; et enfin, nous avons, de façon préliminaire, mis en valeur un rôle nouveau de la kinase HRI, connue pour être impliquée dans la formation des GS (Fournier et al,2010), dans la réponse au stress chimiothérapeutique.

CHAPITRE 5. Discussion

Partie 1. Un nouveau rôle de la voie mTOR-eIF4E dans le processus de formation des GS induite par l'agent chimiothérapeutique Bortezomib

Dans le cadre de mon projet principal de doctorat, nous avons étudié les mécanismes d'assemblage des GS induites, entre autre, par le traitement anti-cancer de type chimiothérapeutique. Dans cette optique, nous avons porté une attention particulière aux facteurs d'initiation à la traduction eIF4E, eIF4GI ainsi qu'au facteur 4E-BP1, autre partenaire de liaison d'eIF4E. Nous nous sommes aussi penchés sur le rôle de la kinase mTOR et plus précisément le complexe mTORC1 dans le processus de formation de GS. Pour au final, explorer l'implication de voie oncogénique mTOR-eIF4E dans la formation des GS et la résistance cellulaire associée.

Pourquoi explorer cet axe de recherche précis ? Le fait est que des études antérieures ont démontré que l'inhibition de l'interaction entre le 40S et l'ARNm en inactivant du facteur eIF4A (soit par la Pateamine A ou par l'Hippuristanol) déclenche l'assemblage de GS indépendamment de la phosphorylation d'eIF2 α (Mazroui et al, 2006). D'autres travaux ont aussi démontré que la seule déplétion des facteurs eIF4B ou eIF4H induisait aussi la formation de GS (Mokas et al, 2009). Par contre, Mokas et al, en 2009, montrèrent aussi que l'inactivation du facteur eIF4E n'induisait de façon non significative la formation de GS. Ce qui devient intrigant. En effet, le rôle actif d'eIF4E dans le processus de traduction a bien été documenté. En tant que protéine de reconnaissance de la coiffe de l'ARNm, eIF4E (associée à son partenaire eIF4GI) peut être considéré comme le « switch » qui serait responsable de l'initiation de la traduction cap-dépendante (et ce, que l'on soit dans un contexte physiologique sain ou pathologique comme celui du Cancer). Et sachant l'importance d'eIF4E dans le processus de tumorigénèse (Richter et Sonenberg, 2005 ; Sonenberg, 2008), il devenait donc essentiel de comprendre quel rôle pouvait jouer eIF4E dans le mécanisme de formation des GS. De plus, les données de la littérature et la présente étude nous démontrent bien que formation des GS et la Traduction sont des processus intimement liés. Puisque le phénomène de traduction reste le processus principal ciblé par les thérapies anti-cancer et que les GS promeuvent une résistance cellulaire face à divers stress, il s'imposait de mener une analyse plus précise des mécanismes d'assemblage de ces granules.

Notre but, en réalisant le projet de recherche exposé dans cette thèse, fut d'améliorer nos connaissances actuelles sur la biogénèse des GS pour ultimement aider, à notre niveau, à l'élaboration de nouveaux traitements anti-cancers ciblant l'initiation de la traduction.

En premier lieu, il faut garder à l'esprit que jamais un lien ne fut posé entre l'implication de la voie oncogénique mTOR-eIF4E dans la régulation de la biogénèse des GS. Un rapport récent (Wippich et al, 2013) démontra le recrutement de la kinase mTOR au sein des GS induite par stress oxydatif (Arsenite 500µM). De récents travaux (Thedieck et al, 2013) ont mis en évidence un lien entre le complexe mTORC1, dont le constituant Raptor est recruté dans les GS induites par un stress oxydatif sévère (Arsenite 500µM), et l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales dans ces mêmes conditions, démontrant un rôle majeur des GS dans l'inhibition de l'apoptose. Dans nos conditions particulières de stress modéré (e.g : stress dhimiotérapeutique induit par le Bortezomib), nous n'observons pas de relocalisation de mTOR au sein des GS précédemment formé ; suggérant ici un rôle régulateur de mTOR plutôt que celui de protéine d'échafaudage. D'où l'une de nos hypothèse de travail qui suggérait une action de mTOR sur la voie régissant la formation des GS médiées par eIF4E.

Dans un premier temps, nous avons donc exploré le rôle d'eIF4E dans le processus de formation de ces granules. En effet, nous en savons encore peu sur le recrutement et le rôle des facteurs d'initiation de traduction dans la formation des GS. Notre intérêt s'est donc porté sur eIF4E car tel que dit précédemment, en tant que protéine de reconnaissance de la coiffe des ARNms, le facteur eIF4E est une cible majeure de la régulation traductionnelle et donc une cible thérapeutique très convoitée dans le contexte du cancer. Dans le modèle que nous commençons à établir, eIF4E apparaît comme un facteur déterminant pour la formation des GS induites pas un stress modéré de type chimiothérapeutique ou oxydant. Son absence préviendrait l'assemblage de ces entités. C'est un rôle

nouveau qui est ainsi mis en évidence pour eIF4E ; celui de promoteur de la formation des GS. Néanmoins, nous n'omettons pas la possibilité qu'eIF4E puisse agir de concert avec d'autres facteurs de signalisation cellulaire pour promouvoir l'assemblage des GS. En effet, nous avons utilisé le composé pharmacologique 4EGI-I pour inhiber l'action d'eIF4E au sein des cellules cancéreuses soumises au Bortezomib ou à l'Arsenite. Ce composé est connu pour avoir des 'off-targets' (Moerke et al, 2007). Dès lors, il est bien possible que ses 'off-targets' puissent aussi intervenir d'une manière encore non élucidée à ce jour, dans l'assemblage des GS.

Par ailleurs, ces premiers résultats ont aussi éveillés notre curiosité quant à l'implication possible de l'interaction entre eIF4E et eIF4GI dans la formation des GS. Il faut se rappeler que la fonction spécifique d'eIF4E dans la cellule va dépendre du partenaire protéique avec lequel elle est associée. Ainsi, la surface dorsale convexe d'eIF4E se présente comme le lieu de compétitions entre différents partenaires/régulateurs. A date, on connaît deux partenaires principaux d'eIF4E, à savoir : 4E-BP1 ou eIF4GI. Nous reviendrons sur son interaction avec 4E-BP1, ultérieurement dans la discussion.

Intéressons-nous d'abord au partenaire de liaison eIF4GI. En effet, l'association d'eIF4E à la coiffe est stabilisée par eIF4GI, ce qui entraîne l'activation de l'initiation de la traduction. Il est donc opportun de s'interroger sur le rôle d'eIF4GI, partenaire essentiel d'eIF4E pour initier la traduction, dans la formation des GS. Sa déplétion affecte dramatiquement la formation des GS induites par le Bortezomib ou l'Arsenite. Dès lors, on peut déduire, que tout comme eIF4E, eIF4GI est un facteur déterminant pour induire la formation des GS. Aussi, ces premiers résultats présupposent d'un rôle nouveau pour l'interaction eIF4E-eIF4GI. En plus d'être responsable de l'initiation de la traduction cap-dépendante, l'interaction eIF4E-eIF4GI jouerait un rôle dans l'assemblage initial des GS. Nous approfondirons cet aspect ultérieurement dans la discussion. Cherchons d'abord à comprendre qui pourrait être situé en amont de cette interaction et qui régulerait positivement ou non sa formation et donc ultimement, l'assemblage des GS. Les connaissances actuelles sur le processus de la traduction coiffe-dépendante nous permettent de placer en première ligne, le complexe Kinase mTORC1 comme

possible régulateur de l'interaction eIF4E-eIF4GI. En effet, la cascade de signalisation de mTORC1 est la voie principale connue pour régir la traduction médiée par eIF4E. Nous avons donc émis l'hypothèse que mTORC1 pourrait être impliqué dans la formation des GS à travers la stimulation d'eIF4E. Pour étayer l'importance du rôle de la kinase mTORC1 dans ce processus, nous nous sommes aussi référés à une étude récente décrivant la localisation des composants de mTORC1 au sein des GS chez les mammifères. Notons que ces GS furent induites par des conditions de stress sévères telles que la présence de 500 μ M d'Arsenite (Wippich et al, 2013). Dans les conditions de stress modéré utilisés au cours de notre étude, mTOR est à peine détectée dans les GS, ce qui rend peu probable la possibilité que mTORC1 pourrait servir par lui-même de complexe d'échafaudage à la formation des GS. Par contre, mTORC1 pourrait intervenir en tant que régulateur de l'assemblage des GS. Comment : en autorisant ou non l'interaction d'eIF4E avec eIF4GI. Par quel biais ? En allant phosphoryler 4E-BP1 qui immédiatement relâcherait eIF4E. Par ailleurs, ceci laisserait entendre l'existence d'un rôle possible pour 4E-BP1 dans la voie de formation des GS induite par nos conditions de stress particulières. Nous y reviendrons par la suite.

Concernant le rôle de mTORC1, nous avons constaté que son inactivation pharmacologique ou sa déplétion abrogerait l'interaction eIF4E-eIF4GI et de ce fait, la formation des GS dans les conditions de stress modéré de Bortezomib. Par quel biais mTORC1 exécute son action dans la voie de formation des GS médiée par l'interaction d'eIF4E-eIF4GI ? A ce stade de réflexion, il convient de se rappeler qu'il existe une compétition entre les facteurs eIF4GI et 4E-BP1 pour s'associer à eIF4E. Séquestré par 4E-BP1, eIF4E ne peut jouer son rôle au sein de la cellule. Il convient donc d'étudier le niveau d'implication de 4E-BP1 dans la formation des GS médiée par mTORC1-eIF4E. Par ARN interférence, nous avons abolit l'expression du facteur 4E-BP1 au sein des cellules cancéreuses stressées. Dans ce contexte ci, nos résultats rapportent une préservation de l'interaction

entre eIF4E-eIF4GI et l'assemblage de GS. Ce qui manifeste d'un rôle antagoniste de 4E-BP1 dans la formation de ces granules. Dans la « configuration cellulaire de stress », on présume que 4E-BP1 viendrait emprisonner eIF4E qui, rendu indisponible, ne pourrait plus s'associer à eIF4GI et donc « initier » l'assemblage des GS. Pour étayer ce premier résultat, nous avons inhibé l'activité kinase de mTOR au sein de cellules cancéreuses stressées. Les résultats obtenus démontrent un « perte » de l'interaction entre eIF4E et eIF4GI ainsi que l'inhibition de la formation des GS. Nos résultats suggèrent donc un nouveau rôle de 4E-BP1, dans son état hypophosphorylé. Il agirait en inhibant la formation des GS via la séquestration d'eIF4E ; et de ce fait, empêchant l'association d'eIF4E et eIF4GI qui semble être à l'origine de l'assemblage des GS. Cette notion est encore étayée par des expériences de surexpression de mutants de 4E-BP1. Ceci soutient le fait que l'effet antagoniste de 4E-BP1 sur la formation des GS est médiée par sa forme hypophosphorylé. Il serait donc intéressant d'investiguer le niveau de phosphorylation minimal nécessaire pour que, dans nos conditions de stress, 4E-BP1 se dissocie d'eIF4E. Enfin, notons que la diminution de 4E-BP1 n'empêche pas la formation des GS induite par l'agent chimiothérapeutique Bortezomib ou par stress oxydatif. Ceci corrobore les données évoquées précédemment dans les travaux de Fujimura et collaborateurs qui démontrent que la déplétion de 4E-BP1 n'affecte pas l'assemblage des GS induites par l'arsénite mais seulement les GS induites par le sélénite. Dans cette même étude, les auteurs ont aussi montré que TSC2, qui est situé en amont de mTOR, n'est pas directement impliqué dans le contrôle de la formation des GS induites par le sélénite. Ce qui diffère du modèle mis en place par nos résultats et qui place mTOR dans le rôle de chef d'orchestre de l'assemblage des GS, en condition de stress chimiothérapeutique ou oxydatif modéré. Dès lors, nos résultats couplés à l'étude de Fujimura et al, illustrent le fait que le mécanisme de formation des GS est spécifique au type de stress qui induisent ces GS.

En parallèle, lors de l'interprétation des résultats, nous avons constaté non seulement une diminution du nombre mais aussi une altération de la taille des GS dans les cellules prétraitées avec les inhibiteurs de mTOR, PP242 ou Torin-1. Le diamètre de ces GS diminue (de $\geq 2\mu\text{m}$ à $\leq 1\mu\text{m}$). Nous imaginons que leur

taille est fonction de la « somme de travail » qui s’y effectue ou de leur « intégrité » à être considéré comme des GS bona fide (GS canonique de type 1). Dès lors, on peut supposer que ces granules pourraient représenter une nouvelle classe de GS. A la même manière que ces GS non canonique « de type 2 », qui ont un taille réduite, récemment mises en évidence dans l’étude de Fujimura et al (2012) et induite par le minéral Sélénite. En perspective, il serait intéressant de comprendre quel est le rôle et quels sont les constituants de ces GS de tailles inférieures. On peut supposer qu’elles sont soit des GS à l’état de nucléation ou au contraire, engagées dans un processus de désassemblage forcé suite au traitement avec l’inhibiteur pharmacologique de mTOR. Notons que l’analyse de nos résultats sur la formation des GS montrait aussi une phosphorylation du facteur eIF2 α . Celle-ci n’était par altérée malgré l’inhibition de la voie mTOR-eIF4E. A l’instar des travaux de Fujimura et al (2012), qui eux aussi, observaient la phosphorylation d’eIF2 α lors de la formation de leurs GS non canoniques de type 2. Dans ces même travaux, le modèle de formation de ces GS particulières serait favoriser par l’association de eIF4E avec 4E-BP1. Aussi, la phosphorylation d’eIF2 α favoriserait la formation de ces GS de type 2. L’ensemble de ces données suggère un rôle possible et « parallèle » de la phosphorylation d’eIF2 α et de la voie mTOR-eIF4E dans le mécanisme de formation de nos GS, induites par stress chimiothérapeutique et oxydatif. Ceci est d’ailleurs supporté par les travaux menés au laboratoire de Fournier et al, 2010 et Gareau et al, 2011 qui illustrent l’importance de la kinase HRI dans la voie eIF2 α phospho-dépendante de formation des GS induite par le Borezomib.

Par ailleurs, il reste à définir comment agit la voie de signalisation mTORC1-eIF4E pour initier la formation des GS induites par un stress chimiothérapeutique modéré. Nos précédents résultats ont montré un rôle possible de l’interaction d’eIF4E-eIF4GI dans le processus d’assemblage initial des GS. Comment ? En

interagissant directement avec les facteurs promoteurs des GS. En effet, Hilliker et collaborateurs ont ainsi mis en évidence, chez la levure, que la protéine Ded1/DDX3 pouvait directement interagir avec eIF4GI et s'assembler sous la forme d'un complexe Ded1-ARNm-eIF4F qui s'accumule dans les GS. En parallèle, Rajyaguru et associés ont démontré, toujours chez la levure, que la protéine Sdc6 inhibe la traduction en formant un complexe avec eIF4E et eIF4G qui peut s'accumuler dans les GS. Considéré dans leur ensemble, ces travaux nous présentent une pléiade d'acteurs de la traduction qui interagissent avec eIF4E ou eIF4GI, en réponse au stress et qui sont retrouvés au sein des GS. A l'instar de l'hélicase DDX3 qui, en s'associant à PABP1, jouerait un rôle de nucléation dans l'assemblage des GS lors de la réponse cellulaire au stress de type oxydatif et choc thermique (Shih et al, 2012). Collectivement, ces travaux nous amène à repenser le rôle de ces protéines qui réprésentent la traduction (Sdc6, DDX3, Ded1, PABP1...) et à les entrevoir comme des facteurs promouvant la formation des GS. Ultimement, nous investiguerons leur rôle dans notre modèle de formation des GS médiée par l'interaction « figée » d'eIF4E-eIF4GI. La régulation de la formation de cette interaction est orchestrée, en amont, par mTORC1. Nous donc avons regardé l'impact des inhibiteurs de mTOR (PP242 ou Torin-1) sur le processus de synthèse protéique et l'induction des GS. Les inhibiteurs de mTOR, seuls, ont peu d'effet sur l'initiation de la traduction. Et il n'y a pas de formation « spontanée » des GS après traitement avec PP242 ou Torin-1. Plusieurs travaux (Thoreen et al, 2012 ; Dowling et al, 2010 ; Hsieh et al, 2012 ; Larsson et al, 2012) ont démontré que l'inhibition de mTORC1 inhibait sélectivement la traduction d'un sous-ensemble d'ARNms particuliers ; ce qui corrobore nos données illustrant un profil de traduction général très faiblement altéré dans ces mêmes conditions. De plus, la synthèse protéique de ces ARNms dépend de la fixation d'eIF4E sur la coiffe de l'ARNm. Nous supposons donc que la perte de cette association par inhibition en amont de mTORC1 altère le recrutement de ces ARNms au sein des GS. Elle empêcherait aussi le recrutement des facteurs qui ont fonction de lier ces ARNms et qui promeut, habituellement, la formation des GS. A l'instar de la protéine de liaison à l'ARNm nommée CUGBP1; et qui permet le recrutement de l'ARNm p21 en condition de stress chimiothérapeutique ainsi que nous l'avons montré dans l'études intitulé «

p21(WAF/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to Bortezomib-mediated apoptosis. ». Pour faire un rapide aparté sur ce travail, nous avons montré que le traitement des cellules cancéreuses avec le Bortezomib induisait une surexpression de p21WAF1/CIP1. Cette surexpression est associée à une résistance cellulaire à l'apoptose. En fait, nos résultats démontrent que le Bortezomib entraîne la régulation positive de l'expression de p21 en entraînant l'accumulation et la stabilisation de l'ARNm de p21, recruté dans les GS par le biais de la protéine CUGBP1. Considérant l'ensemble de ces données, notre modèle de travail serait résumerait à travers le schéma suivant :

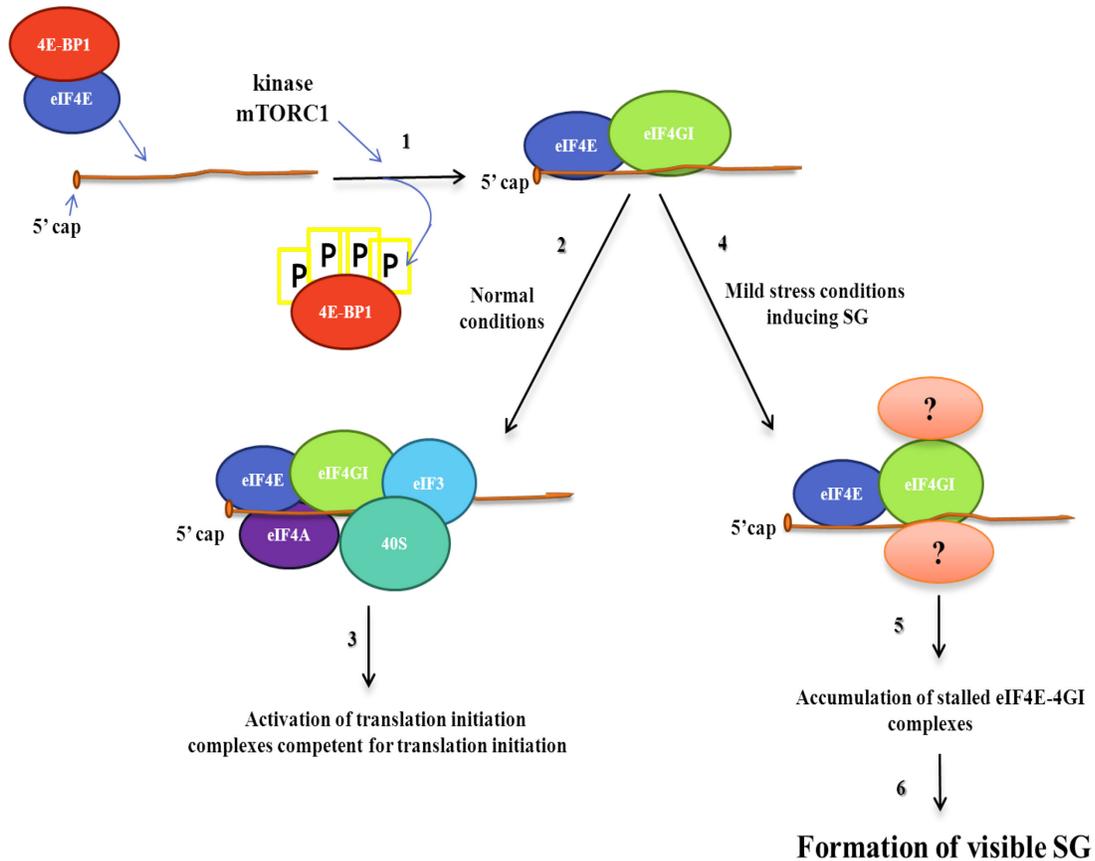


Schéma du mécanisme de formation de GS empruntant la voie eIF4E-mTOR.

Que la cellule soit dans des conditions physiologiques saines ou soumises à un stress modérée de type chimiothérapeutique (par exemple), la kinase mTORC1 phosphoryle le facteur 4E-BP1. Celui-ci relâche eIF4E qui sera disponible pour son interaction avec eIF4GI. En condition de stress induisant la formation des GS, ce même complexe eIF4E-eIF4GI jouerait un rôle dans la nucléation des GS. On imagine que ce complexe protéique pourrait servir « d'échafaudage » au recrutement de facteurs, encore non identifiés, qui figeraient l'interaction eIF4E-eIF4GI. C'est l'accumulation de ce complexe eIF4E-eIF4GI-protéine(s) X « figé » dans une posture inactive qui aboutirait à la formation des GS. Il convient, dans le futur, de déterminer l'identité des facteurs qui figeraient l'interaction eIF4E-eIF4GI.

A présent que notre modèle de formation des GS est établi, nous avons souhaité explorer le lien qui commence à se dessiner, depuis peu dans la littérature, entre chimiorésistance et formation des GS. Nous avons précédemment montré que l'inhibition de la voie oncogénique mTORC1-eIF4E inhibe la formation des GS induite par l'agent chimiothérapeutique Bortezomib. Ceci suggère que la formation du complexe « figé » eIF4E-eIF4GI promeut l'assemblage des GS en condition de stress initialement thérapeutique. Il faut se rappeler, comme détaillé dans l'Introduction, que la formation des GS participe à l'inhibition de la mort des cellules cancéreuses en réponse à des traitements de type chimiothérapeutiques et génotoxiques (Fournier et al, 2010 ; Gareau et al, 2011 ; Arimoto et al, 2008). Ceci corrobore le rôle précédemment décrit des GS dans la promotion de la radiorésistance des cellules tumorales (Moeller et al, 2004).

Il convient à présent de comprendre comment la formation des GS médiée par la voie mTORC1-eIF4E-eIF4GI peut réguler de façon négative la mort des cellules cancéreuses initialement soumises à l'agent chimiothérapeutique Bortezomib. Dans cette optique, un modèle fut précédemment mis en évidence au laboratoire (Gareau et al, 2011) pour expliquer le rôle des GS dans la survie cellulaire : à savoir la surexpression du facteur de survie cellulaire p21. Il fut démontré que les conditions de stress, incluant le traitement thérapeutique anti-cancer, induisaient une surexpression de la protéine. La surproduction de protéine p21 inhibe ensuite l'activité de la machinerie apoptotique, permettant la résistance des cellules à la mort engendrée par le stress (Asada et al, 1999 ; Gartel et al, 2002). Nous avons récemment identifié ce mécanisme. Celui-ci fait intervenir les GS qui vont stabiliser l'ARNm de p21 précédemment recruté en leur sein avec l'aide la protéine de liaison à l'ARNm CUGBP1. Ce pool d'ARNm de p21 ainsi accumulé est relâché dans le cytoplasme après la désassemblage des GS où il va abondamment être converti en protéine. La surproduction de p21 interfère avec la

mort cellulaire, induisant ainsi une chimiorésistance. L'ensemble de nos données suggèrent que le modèle, précédemment énoncé se déroule selon deux étapes :

- Dans la première étape, l'ARNm de p21 est quantitativement séquestré dans les GS par le biais de la protéine CUGBP; cette séquestration va permettre de protéger de la dégradation, l'ARNm p21 qui est normalement très instable. Ainsi l'ARNm de p21 va s'accumuler et être stabilisé pendant la période stress cellulaire.

- La deuxième étape se déroule lors du désassemblage des GS qui va mener à la libération d'une grande quantité d'ARNm de p21 précédemment accumulé. Cet ARNm de p21 est maintenant disponible pour la traduction immédiate. Ceci va entraîner une synthèse massive de p21WAF1/CIP1. Cette « surexpression » de la protéine va p21 va, ultimement, aider à « court-circuiter » l'entrée en apoptose de la cellule malgré l'inhibition du protéasome régit par le Bortezomib. Considéré dans leur ensemble, nos résultats montrent que dans des conditions d'inhibition du protéasome induite par le Bortezomib, CUGBP1 est nécessaire pour ségrégation de l'ARNm de p21 au sein des GS; favorisant ainsi sa stabilisation. A ce stade, le mécanisme responsable de la stabilisation de l'ARNm de p21 dans les GS reste à déterminer. Ainsi, le mécanisme de formation des GS stabilisant l'ARNm de p21 pourrait être associé à la voie de formation que nous avons précédemment mis en évidence et qui implique la voie oncogénique mTOR-eIF4E.

Notre but fut donc d'essayer de « réconcilier » ces deux modèles en un, espérant mettre en évidence un mécanisme qui expliquerait le processus de chimiorésistance qui peut être associé à formation des GS induite par les thérapies anti-cancer de type chimiothérapie. Dans cette optique, nous avons regardé si l'inhibition de la voie mTORC1-eIF4E-eIF4GI, par déplétion d'eIF4E ou eIF4GI ou mTOR ou en utilisant l'inhibiteur de mTOR PP242, pouvait inhiber la suractivation de la voie anti-apoptotique associé p21 dans les cellules cancéreuses traitées avec le Bortezomib. En effet, on observe non seulement, une diminution du niveau d'expression de l'ARNm de p21 mais aussi une baisse significative de l'expression protéique de p21, couplé à inhibition de la formation des GS. En accord avec ces résultats, on constate que la déplétion d'eIF4E ou

d'eIF4GI ou de mTOR ou son inhibition pharmacologique va permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose in vitro. Dès lors, nous pouvons imaginer que la régulation négative de l'expression de la protéine p21 agisse en synergie avec l'inhibition pharmacologique de mTOR pour réinstaurer l'apoptose au sein des cellules traitées avec le Bortezomib. Cependant, nous ne négligeons pas le fait que des voies de signalisation supplémentaires pourraient intervenir à cette fin. En perspective, il serait intéressant d'identifier ces cascades de signalisation complémentaires.

Dans une démarche de recherche translationnelle, nous avons voulu exporter notre modèle « unifié » de formation des GS, vers un aspect in vivo. Et plus précisément, in ovo. Par le biais de tests sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet, nous avons montré que l'inactivation pharmacologique de mTOR ou la déplétion de p21 inhibe la croissance des tumeurs développées par les embryons de poulet précédemment traités avec l'agent chimiothérapeutique Bortezomib. Pour asseoir ces premiers résultats, nous réitérons ces expériences sur des xenogreffes de modèles murins. Au final, nous avons, par ces derniers résultats, réussi à associer notre modèle de formation des GS gouverné par la voie oncogénique mTORC1-eIF4E et le modèle expliquant le rôle des GS dans la survie cellulaire et qui emprunte la voie de surexpression du facteur de survie cellulaire p21. Notre étude vient donc de poser un lien direct entre l'assemblage des GS et la résistance des cellules cancéreuses à mourir pendant le processus de chimiothérapie.

En résumé, ce travail de doctorat a mis en évidence un rôle nouveau pour la voie de signalisation oncogénique mTORC1-eIF4E-eIF4GI dans le processus de chimiorésistance induit par le Bortezomib. Ainsi les GS, dont la formation est gouvernée par mTORC1, constitueraient une voie supplémentaire par laquelle la kinase mTOR peut déclencher la chimiorésistance cellulaire.

Ces travaux constituent donc une base pour de prochaines études concernant la composition et la régulation de ces complexes eIF4E-eIF4GI « figés » et qui seraient à la base du processus d'assemblage des GS. Dans cet état d'esprit, il serait important de tester l'hypothèse que la formation des complexes eIF4E-eIF4GI joue un rôle clé dans la chimiorésistance provoquée par les GS. Pour cela, il devient nécessaire de déterminer si eIF4GI induit la formation de GS en présence de Bortezomib mais aussi de Sorafenib ou Lapatinib via des interactions avec des facteurs spécifiques. eIF4GI est un facteur à haut-poids moléculaire (220 kDa) qui agit comme protéine d'échafaudage lors de l'initiation de la traduction. eIF4GI peut aussi interagir avec des répresseurs de la traduction. Des études récentes ont établi eIF4G comme une protéine servant d'échafaudage pour le recrutement de répresseurs spécifiques de la traduction et menant à la formation des GS chez la levure (Rajyaguru et al, 2012). La liaison de ces facteurs à eIF4G est eIF4E-dependante et se produit spécifiquement en condition de stress. Ces interactions figent les complexes eIF4E-eIF4G sous forme inactive dont l'accumulation résulte en la formation des GS.

Pour conclure, nos travaux ont permis de mettre en évidence un rôle nouveau pour les facteurs d'initiation de la traduction qui peuvent, en condition de stress, jouer un rôle de repression de l'activité cellulaire.

Partie 2. De nouveaux inducteurs pour la formation des GS en condition de stress chimiothérapeutiques : cas du Sorafenib et du Lapatinib

Lors du processus de chimiothérapie, les cellules cancéreuses activent des mécanismes de défenses qui leur permettent de résister aux traitements et de proliférer. La résistance des cellules tumorales aux thérapies anti-cancer est l'un des obstacles majeurs pour la guérison des patients atteints du cancer. Nos travaux ont pour but de comprendre comment les cellules cancéreuses développent une résistance aux traitements chimiothérapeutiques, et plus particulièrement d'investiguer un des mécanismes de défenses mis en place par la cellule tumorale et qui implique la formation de granules de stress (GS). Ces GS sont des entités cytoplasmiques contenant entre autre, des facteurs d'initiation de la traduction, des ARNms, des protéines de liaison à l'ARN et des molécules de signalisation codant notamment pour des facteurs de mort cellulaire (Anderson et Kedersha., 2008). Les GS inhibent la mort cellulaire par apoptose, entraînant une chimiorésistance des cellules cancéreuses (Arimoto et al, 2008). Cependant les mécanismes par lesquels les GS sont formées et entraînent une résistance aux thérapies anti-cancers, restent largement inconnus.

Des études menées au laboratoire ont récemment permis d'établir un modèle de ces cellules cancéreuses décrivant la formation des GS induite par le Bortezomib (Velcade®) (Forunier et al, 2010). Le Bortezomib est un inhibiteur du protéasome approuvé par le FDA pour le traitement de myélomes et autres tumeurs hématologiques (Sterz et al, 2008). Cependant, les tumeurs solides sont résistantes au Bortezomib (McConkey et Zhu., 2008) et nos expériences suggèrent qu'une telle chimiorésistance serait associée aux mécanismes induisant la formation de GS. Il est donc légitime de penser que la formation des

GS n'est pas restreinte au Bortezomib. Nos travaux ont mené à la mise en place d'un criblage des drogues chimiothérapeutiques afin d'identifier de nouveaux inducteurs des GS. Nos analyses ont permis d'identifier le Sorafenib (Nexavar®) et le Lapatinib (Tykerb/Tyverb®) comme deux puissants inducteurs des GS au sein des cellules tumorales. Nos résultats indiquent que le mécanisme d'action de ces 2 drogues semble être similaire au Bortezomib et qu'elles induisent la formation des GS en inhibant l'initiation de la traduction. De plus, l'assemblage des GS induites par Sorafenib ou Lapatinib semble aussi dépendre de la voie de formation mTORC1-eIF4E, ainsi que le suggèrent nos résultats préliminaires.

Un nouvel inducteur de granules stress dans la famille des agents chimiothérapeutiques : Le Sorafenib.

Le Sorafenib bloque l'action des récepteurs de type tyrosine kinase (VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), c-Kit et RET) et il inhibe, en aval, l'activité sérine/thréonine kinase de Raf afin d'empêcher la croissance de la tumeur par le biais de stimuli anti-angiogéniques, anti-prolifératives et / ou pro-apoptotiques. Il est utilisé dans le cadre de chimiothérapie ciblant les hépatocarcinomes et les carcinomes rénaux. Considérant la thématique de recherche de ce travail de thèse et désirant faire le lien entre notre modèle de formation des GS induites par stress chimiothérapeutique et le Sorafenib, nous constatons déjà que plusieurs travaux ont montré une dérégulation de la voie de signalisation PI3L/AKT/mTOR dans les hépatocarcinomes tout comme dans les carcinomes rénaux, d'où l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR en thérapie combinatoire avec le Sorafenib (Roulin et al, 2011 ; Gedaly et al, 2012). De façon concomitante, des travaux ont mis en évidence que le Sorafenib pouvait induire l'apoptose des cellules d'hépatocarcinomes en réduisant la phosphorylation d'eIF4E et en régulant négativement le niveau d'expression de Mcl-1, un facteur pro-survie qui appartient à la même famille que le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Rahmani et al, 2005 ; Liu et al, 2006 ; Gauthier et Ho, 2013). Et dans un contexte de

résistance des cellules à l'action du Sorafenib, on peut imaginer inclure dans ces modèles, l'intervention des GS. En effet, nos résultats apportent l'évidence que le Sorafenib induit une réponse au stress similaire à celle du Bortezomib. Nous observons l'inhibition de la traduction, une phosphorylation, bien que faible, du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et la formation de GS. Une explication plausible pour l'inhibition générale de la traduction provoquée par Sorafenib est l'induction de l'UPR (Unfolded Protein Response), un processus d'adaptation qui bloque la traduction des protéines et permet aux cellules de compenser l'accumulation des protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) (Wu et Kaufman, 2006, Xu et al, 2005). En effet, les travaux de Rahmani et collaborateurs (2007), démontrent que le traitement avec Sorafenib entraîne une augmentation rapide de la phosphorylation d'eIF2 α et de PERK, une accumulation GADD153 et GADD34, et l'épissage de XBP1. Ces événements sont des marqueurs typiques du stress du RE, associé à la voie d'UPR (Ron D, 2002 ; Xu et al, 2005). Compte tenu du rôle bien établi de phosphorylation eIF2 α dans l'inhibition de la traduction des protéines (Boyce and Yuan, 2006; Ron D, 2002), il est tentant de spéculer que l'inhibition de la synthèse protéique induite par Sorafenib est médiée par la phosphorylation d'eIF2 α . Toutefois, il a été mis en évidence que Sorafenib peut inhiber la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Rahmani et al, 2005). La possibilité que cette action contribue également à l'inhibition de la traduction ne doit pas être négligée.

En outre, nos investigations sur le mécanisme d'assemblage de ces GS suggèrent l'implication de la voie mTOR-eIF4E que nous avons précédemment décrit dans la section I de cette discussion générale. Enfin, nous constatons que les cellules Hep3B, résistantes au Sorafenib (Ou et al, 2010) et formant des GS, ont des difficultés à entrer en apoptose lors d'une exposition prolongé au Sorafenib. Considérant l'ensemble de ces données préliminaires, les travaux menés au laboratoire et les évidences de la littérature, nous pouvons imaginer que les GS

induites par Sorafenib vont agir selon un mode d'action similaire au Bortezomib pour protéger les cellules cancéreuses de la mort cellulaire.

Pour cela, nous nous basons sur les travaux de Gareau et al, 2011. Dans cette étude, nous démontrons que le traitement des cellules cancéreuses avec le Bortezomib induit une surexpression du facteur de survie p21WAF1/CIP1 (Lazzarini et al 2008). Cette surexpression est associée à une résistance cellulaire à l'apoptose. En fait, nos résultats démontrent que le Bortezomib module la régulation positive de l'expression de p21 en entraînant l'accumulation et la stabilisation de l'ARNm de p21, recruté dans les GS par le biais de la protéine CUGBP1. Ainsi, dans notre modèle de formation de GS « anti-apoptotiques » induites par Sorafenib, nous pouvons postuler que p21 serait séquestré dans ces GS, ce qui contribuerait à la chimiorésistance des cellules d'hépatocarcinomes. De plus, si nous considérons les travaux de Rahmani et al, en 2005 et de Liu et al, en 2006, nous pouvons émettre l'hypothèse que le facteur de survie Mcl-1 pourrait, lui-même, être stabilisé par le biais des GS induites par Sorafenib. Ce qui mènerait à la résistance des cellules cancéreuses. Enfin, une étude (Liang et al, 2013), a testé l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie causée par les effets anti-angiogéniques de la thérapie Sorafenib pourrait induire une résistance au Sorafenib comme une réponse adaptative cytoprotective, limitant ainsi l'efficacité de cet agent chimiothérapeutique. Les expérimentateurs ont constaté que les modèles murins et les HCC cliniquement résistants au Sorafenib, présenter une augmentation de l'hypoxie intratumorale. Cette résistance au Sorafenib serait médiée par l'activation d'HIF-1 α et de NF κ B (Liang et al, 2013). Ces travaux, corrélés à ceux de Moeller et al. 2004, qui démontraient la formation de GS dans un contexte d'hypoxie intratumorale, nous permettent d'asseoir un rôle important des GS dans le processus de chimiorésistance. A présent, il s'agit de confirmer le rôle de la voie oncogénique mTORC1-eIF4E dans la formation des GS induites par Sorafenib et d'identifier les facteurs qui sont recrutés dans ces GS et qui participent à la résistance des cellules tumorales dans ce contexte de nouveau stress chimiothérapeutique.

Formation des granules stress induites par une nouvelle drogue chimiothérapeutique : Le Lapatinib

Le Lapatinib (Tyverb, Tykerb) est un double inhibiteur de récepteur de type tyrosine-kinases qui ciblent les membres de la famille de récepteurs aux facteurs de croissance épidermique EGFR (également appelé HER1 ou ErbB1) et HER2 (McArthur et al, 2009 ; Spector et al, 2007 ; Dhillon et al, 2007 ; Nielsen et al, 2009 ; Bilancia et al, 2007). Il est utilisé dans lors d'un traitement du cancer du sein. De nombreux travaux suggèrent d'une part, la dérégulation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR dans les cellules du cancer du sein (Liu et al, 2011 ; Jegg et al, 2012 ; Zhu et al, 2013), et d'autre part l'activation de mTOR dans le cadre de résistance des cellules cancéreuses à l'action du Lapatinib. A la lumière de ces données, nombreuses études évoquent l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR en thérapie combinatoire avec le Lapatinib (Liu et al, 2011 ; Gayle et al, 2012 ; Vinayak et Carlson, 2013). En parallèle, les travaux de Liu et al, en 2011, démontre que l'utilisation combinée de Lapatinib avec un inhibiteur de mTOR entraîne non seulement la restauration de l'apoptose dans les cellules triples-négatives de cancer du sein mais aussi une diminution de l'activation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Considérant l'ensemble de ces données et les résultats qui constituent cette thèse, on peut facilement émettre l'hypothèse d'une intervention des GS dans le contexte de chimiorésistance des cellules du cancer du sein au Lapatinib.

Ainsi, nos résultats ont mis en évidence la capacité du Lapatinib à provoquer une réponse au stress similaire à celle du Bortezomib. En effet, les cellules du cancer du sein, résistantes à Lapatinib (les lignées T47D et MCF7), inhibe l'initiation de la traduction, une faible phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et la formation de GS. De plus, des premières données suggèrent l'implication de la voie mTOR-eIF4E dans le mécanisme d'assemblage

de ces GS que nous avons précédemment décrit dans la section I de cette discussion générale. Enfin, nous constatons que les cellules MCF7, résistantes au Lapatinib et formant des GS, ont des difficultés à entrer en apoptose lors d'une exposition prolongée au Lapatinib. A la lumière de ces premiers résultats, des travaux de Gareau et al, en 2011 que nous avons résumés précédemment et les évidences de la littérature, nous pouvons imaginer que les GS induites par Lapatinib vont agir selon un mode d'action similaire au Bortezomib pour protéger les cellules cancéreuses de la mort cellulaire.

Partie 3. Un rôle nouveau pour la Kinase de stress HRI, protagoniste important dans la formation des GS induites par la drogue anti-cancer Bortezomib

Il est bien connu que dans des conditions de stress, la phosphorylation eIF2 α déclenche la formation GS (Anderson et Kedersha, 2008). Cet état de phosphorylation d'eIF2 α est gouverné par quatre kinases qui sont capables de phosphoryler la sous-unité α de ce même facteur. Parmi ces kinases, on retrouve HRI. Ces événements mènent généralement à une inhibition de la traduction et subséquemment, à l'apparition de GS.

HRI est connu pour être fortement exprimé dans les cellules érythroïdes, bien que l'expression minimale de HRI se trouve également dans une large gamme de cellules non érythroïdes (Berlanga et al, 1998; Mellor et al, 1994). Un précédent travail, mené au laboratoire (Fournier et al, 2010) a donc dévoilé un rôle crucial d'HRI dans la résistance des cellules cancéreuses au Bortezomib, au moins en partie via l'induction des GS. Néanmoins, il est curieux qu'HRI joue un rôle essentiel dans la promotion de la résistance à l'apoptose des cellules non-érythroïdes comme les HeLa.

Dans cette optique, en collaboration avec ma collègue Marie-Josée Fournier, j'ai cherché à comprendre la fonction de la kinase HRI dans les conditions de stress chimiothérapeutique induites par le Bortezomib. Et plus précisément, nous avons regardé si HRI était impliqué dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes de la cellule cancéreuse en condition de Bortezomib, induisant la formation des GS. Notre travail actuel démontre que la déplétion d'HRI, en plus d'empêcher la formation des GS et de diminuer la phosphorylation d'eIF2 α induit par traitement avec le Bortezomib (Fournier et al, 2010; Martel D., 2013 et données non montrées), entraîne une régulation transcriptionnelle et

traductionnelle de l'expression de groupes de gènes particuliers impliqués dans des fonctions telles que le cycle cellulaire, la croissance et prolifération de la cellule, l'apoptose ...etc. Toutefois, la suite des expériences menées au sein du laboratoire permettra d'approfondir le mécanisme moléculaire qu'emprunte HRI pour inhiber ou mener à l'accumulation de ces ARNms. En effet, il reste à déterminer s'il s'agit d'une action directe ou indirecte de HRI sur ces ARNms. Considérant le modèle de travail que nous avons exposé dans cette thèse et les travaux de Fournier et al, 2010 et Gareau et al, 2011, on peut aisément supposer l'existence d'une action synergique de la formation des GS et d'HRI dans le but de stabiliser les ARNms ciblées par l'action régulatrice de cette kinase. D'ailleurs, divers travaux peuvent corroborer cette hypothèse dont l'étude menée par Moeller et collaborateurs, en 2004. Dans cette étude, les expérimentateurs montrent que parallèlement à la formation des GS, l'état hypoxique des cellules active la transcription spécifique d'ARNms codant pour des cytokines de survie. Lors de la radiation de la tumeur, ces ARNms sont recrutés au niveau des GS où ils s'accumulent et où ils sont protégés de la dégradation. Le mécanisme de reoxygénation des tumeurs qui fait suite à la radiation permet le désassemblage des SG, relâchant le pool accumulé des ARNm alors massivement traduits en cytokines telles que le VEGF. Cependant, nous ne négligeons pas le fait qu'HRI puisse intervenir dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de ces gènes par un autre biais que celui des GS. Pour cela, nous analyserons, par la suite, la stabilité des ARNms modulés par HRI en utilisant le test de l'Actinomycine D. De cette façon, nous pourrions vérifier si HRI joue un rôle dans la régulation de ses ARNms cibles en passant par le processus de dégradation des ARNms.

De plus, HRI agit en tant que régulateur négatif de la traduction. En effet, HRI va phosphoryler eIF2 α , ce qui mène à l'inhibition de la traduction. Par ailleurs, plusieurs études suggèrent un rôle de la phosphorylation d'eIF2 α dans la reprogrammation de l'expression génique (Holcik et Sonenberg, 2005) et dans le contrôle de la croissance et différenciation cellulaire (De Haro et al, 1996). La plupart des études concernent l'intervention, en amont, de la kinase PKR mais une homologie significative d'HRI avec les trois protéines kinases, chez la levure, qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Chen et al, 1991) et le fait que HRI, aussi bien que PKR, se substituent fonctionnellement à la kinase GCN2 pour assurer le contrôle traductionnel du gène GCN4 chez la levure (Dever et al, 1993) pourrait suggérer que la kinase HRI joue un rôle crucial dans le cycle cellulaire et la régulation de la croissance cellulaire. Ce qui corrobore nos résultats observés après analyse du micro-array des groupes de gènes sous-exprimés, en condition de stress chimiothérapeutique et lors de la déplétion d'HRI, et dont leur expression module la croissance et prolifération cellulaire (BMP4, GADD45A, TGFB1) mais aussi la carcinogenèse (e.g : CAV1, JUN, HIF1A) et la survie (NFkB1 et FOXO3).

Une autre hypothèse de régulation des gènes par HRI, en condition de stress, serait qu'il agisse au niveau transcriptionnel, en activant des facteurs de transcription spécifiques à la réponse cellulaire au stress. En effet, il a été montré qu'HRI participait aussi à l'adaptation au stress de la cellule en augmentant l'expression de gènes spécifiques tels que Chop et GADD34, qui sont nécessaires pour l'adaptation cellulaire au stress (Chenn JJ., 2007). Ainsi, notre analyse par micro-array indique que la déplétion d'HRI affecte négativement l'expression de facteurs de transcription tels que GADD45B, ATF3, HIF1, NFkB1 qui sont des facteurs de transcription clés, entre autre impliqués dans la réponse au stress et la croissance cellulaire.

Ce qui corrobore l'hypothèse énoncée ci-dessus et démontre un nouveau degré d'implication d'HRI dans la réponse cellulaire au stress, c'est-à-dire, en tant que régulateur de la transcription de séries de gènes spécifiques.

Dès lors, en plus d'être une kinase impliquée dans la réponse cellulaire au stress via la phosphorylation du facteur eIF2 α , l'ensemble de ces résultats indiquent également un nouveau rôle inconnu de la protéine kinase HRI lors du processus de chimiorésistance. HRI semblerait être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, dans la croissance de la cellule et dans le processus de carcinogénèse. Dans le future, nous réaliserons des expériences de synchronisation cellulaire, suivi d'une analyse par cytométrie en flux selon diverses périodes de temps afin de vérifier l'état du cycle cellulaire dans les L'arrêt à une phase particulière du cycle cellulaire suggèrerait ainsi un rôle d'HRI dans la régulation de ce cycle. De plus, nous regarderons dans la direction de nouveaux partenaires pour HRI. En effet, à tout nouveau rôle s'associe de nouveaux partenaires fonctionnels ou substrats. Le cas échéant, nous identifierons ces éventuels substrats par électrophorèse 2D et les possibles partenaires par immunoprécipitations et chromatographe sur colonne d'affinité. De plus, nous investiguerons l'importance de niveaux de phosphorylations de la kinase dans le processus de régulation du cycle et de la croissance cellulaire. Pour cela, nous surexprimerons, dans les cellules déplétées en HRI, des constructions d'HRI mutées sur différents sites de phosphorylation. Ainsi, nous pourrons déterminer quel niveau d'activation de la kinase HRI est nécessaire pour moduler la croissance et la prolifération cellulaire. Collectivement, ces expériences permettront, à la fois, de définir un rôle nouveau d'HRI dans les conditions de stress mais aussi dans les conditions cellulaires dénuées de stress.

Enfin, les données préliminaires obtenus par mon collègue David Martel, lors de l'injection in ovo de cellules issues de la lignée HeLa déplétées de manière stable en HRI (shRNA-HRI), et les résultats obtenus par microarray dans le contexte d'une déplétion d'HRI dans des cellules dénuées de stress, m'ont poussé à explorer un rôle d'HRI dans la taille et croissance des cellules cancéreuses en l'absence de stress physiologique.

En effet, les tumeurs créées par les cellules déplétées en HRI présentaient une masse moyenne significativement plus faible que celles créées par les cellules HeLa shNE contrôles. De plus, l'observation in vitro de ces cellules semblaient croître à une vitesse amoindrie et ce, sans même aucun traitement. Considérés dans leur ensemble, ces résultats illustraient donc une fonction de la protéine HRI non seulement liée à une réponse cellulaire au stress physiologique mais aussi, dans la fonction cellulaire normale, dénuée de stress.

Il devenait donc intéressant de comprendre le degré d'implication d'HRI dans le processus de croissance cellulaire. Nos résultats obtenus par l'analyse des groupes de gènes régulés par HRI dans la condition expérimentale HeLa shNE non traitée versus HeLa shHRI non traitée, ont illustré la modulation de plusieurs voies de signalisation en l'absence d'HRI. En effet, nous avons observé une diminution de l'expression de nombreux facteurs de croissance et de prolifération cellulaire (e.g : BMP4, IGFBP3, SERPINE1) et la surexpression, en grand nombre, de facteurs de transcription (e.g : FOXQ1, HOXA10).

De plus, nos expériences de « cell size determination » obtenus par cytométrie en flux ont clairement montré une diminution de la taille des cellules déplétées de façon stable en HRI. Collectivement, ces résultats nous permettent de proposer, de façon préliminaire, un modèle selon lequel HRI, en activant différents facteurs de transcription, régulerait positivement la taille et croissance de la cellule cancéreuse dénuée de stress.

CHAPITRE 6. Conclusion

Tout d'abord, nous avons identifié de nouveaux promoteurs de la formation des GS. Il s'agit de la protéine de liaison à la coiffe de l'ARNm eIF4E et son partenaire, le facteur d'initiation de la traduction eIF4GI. En amont, la kinase mTORC1 favoriserait, via la phosphorylation de 4E-BP1, la formation des GS gouvernée par l'interaction eIF4E-eIF4GI. À l'appui de ces derniers résultats, on notera que la surexpression de la forme hypophosphorylée de 4E-BP1 inhibe la formation des GS. Comment ? En altérant l'intégrité des interactions entre eIF4E et eIF4GI. De plus, la déplétion de 4E-BP1 restaure la formation des GS et l'interaction eIF4E-eIF4GI dans les cellules stressées traitées avec l'inhibiteur de mTOR, le PP242. Enfin, en inactivant la kinase mTOR ou en inhibant l'expression d'eIF4E ou d'eIF4GI, nous avons observé une inhibition de la voie anti-apoptotique de p21 couplée à une altération de la formation des GS, en condition de stress chimiothérapeutique. Par ce même biais, nous avons constaté une meilleure réceptivité, *in vitro*, des cellules cancéreuses au traitement avec l'agent chimiothérapeutique Bortezomib. Celles-ci étaient sensibilisées à la mort cellulaire normalement induite par le Bortezomib. Enfin, nous avons récapitulé ces résultats dans un modèle *in ovo* et aboutit à une inhibition de la croissance tumorale au sein des embryons de poulet.

Dans la seconde partie des résultats, suite au criblage d'une librairie de drogues anti-cancer, nos efforts ont permis de mettre en évidence deux agents chimiothérapeutiques couramment utilisés dans le cadre de thérapies : Lapatinib et Sorafenib, qui seraient capables d'induire la formation des GS. Ces deux agents anti-cancer sont aussi capables d'inhiber l'initiation de la traduction ; ce qui est en accord avec une réponse typique des cellules au stress. Bien que nos résultats soient au stade de préliminaire, nous avons pu établir que la voie de formation empruntée, au moins en partie, pour l'assemblage des GS serait la voie

précédemment décrite dans cette thèse, à savoir la voie oncogénique mTORC1-eIF4E. Néanmoins, nous ne négligeons pas le fait que la phosphorylation d'eIF2 α ainsi que les kinases associées (telles que HRI) puissent jouer un rôle, dans ce contexte de stress chimiothérapeutique.

Enfin, dans la dernière partie des Résultats, nous avons cherché à comprendre le(s) niveau(x) d'implication de la kinase HRI dans la régulation de l'expression des gènes de cellules soumises ou non à un stress chimiothérapeutique. Nous avons pu observer, suite une analyse par microarray sur des cellules stables dénuées d'HRI, que lors d'un traitement au Bortezomib, la kinase HRI pouvait réguler l'expression d'ARNms appartenant aux familles de gènes impliqués dans des fonctions telles que la réponse au stress, le cycle cellulaire, l'apoptose et surtout la croissance et prolifération cellulaire.

Il reste à déterminer s'il s'agit d'une action directe ou indirecte de HRI sur ces ARNms. Considérant le modèle de travail que nous avons exposé dans cette thèse et les travaux de Fournier et al, 2010 et Gareau et al, 2011, on peut aisément supposer l'existence d'une action synergique de la formation des GS et d'HRI dans le but de stabiliser les ARNms ciblées par l'action régulatrice de cette kinase.

Dans le contexte d'un patient réfractaire à la chimiothérapie, et moyennant l'identification préalable de GS au sein des cellules cancéreuses du patient : notre étude vient de mettre en évidence l'existence d'une fenêtre de temps où l'on serait capable d'inhiber le processus de formation des GS ; et de ce fait, la chimiorésistance.

CHAPITRE 7. Perspectives

En perspective de ce travail, plusieurs axes de recherche devraient être explorés. Dans un premier temps, il s'agit de définir l'identité des facteurs qui « figent » l'interaction eIF4E-eIF4GI et qui mènent à la nucléation des GS. Une étude (Shih et al, 2012) a récemment démontré que l'hélicase à ARN DDX3 pouvait agir comme répresseur d'eIF4E afin de réprimer le processus de traduction. De plus DDX3 est associée au GS. Et elle interagit directement avec PABP. De plus, l'inhibition par ARN interférence de DDX3 affecte l'assemblage des GS. Ainsi, DDX3 peut promouvoir la formation des GS, en association avec eIF4E et PABP. C'est pourquoi il serait intéressant de vérifier si DDX3 agit comme un stabilisateur de l'interaction eIF4E-eIF4GI, lors de l'assemblage des GS induites par stress chimiothérapeutique.

Ensuite, il convient d'explorer le rôle des partenaires d'eIF4E et eIF4GI dans la résistance à l'apoptose médiée par les drogues chimiothérapeutiques comme le Bortezomib, le Sorafenib ou le Lapatinib. En effet, ce présent travail de thèse a, entre autre, mis en évidence que, la déplétion des facteurs impliqués dans la formation des GS tels eIF4E et eIF4GI sensibilisait les cellules cancéreuses au Bortezomib. Donc en utilisant des expériences de déplétion combinées avec des tests de mort cellulaire, nous pourrions vérifier le rôle des partenaires d'eIF4E et eIF4GI dans la résistance des cellules cancéreuses à divers stress chimiothérapeutiques. Enfin, il serait bien de confirmer que la déplétion stable d'eIF4E, ou d'eIF4GI ainsi que celle des partenaires d'eIF4GI sensibiliserait les tumeurs humaines, par le biais de la technique de CAM Assay, au traitement avec le Bortezomib, par exemple.

Ensuite, il conviendrait de vérifier si eIF4GI promeut la formation des GS dans les cellules cancéreuses en condition thérapeutique en agissant comme protéine

d'échafaudage pour le recrutement des répresseurs de la traduction et de définir les domaines d'interaction entre eIF4GI et ses partenaires identifiés. De plus, l'étude de Rajyaguru et al, 2012 montre que l'interaction entre eIF4G et ses partenaires répresseurs de la traduction est médiée par des motifs conservés nommés Arg-Gly-Gly- (RGG) présents chez ces facteurs. Ceci suggère que les motifs RGG jouent un rôle important dans la formation des GS. De plus, les motifs RGG de plusieurs répresseurs de la traduction ont été récemment identifiés comme des séquences clés qui promeuvent la formation des granules à ARN in vitro (Krüger et al, 2013). Dans la poursuite de ce travail de thèse, il sera nécessaire de vérifier le rôle des motifs RGG dans l'interaction d'eIF4GI avec ses partenaires, dans un contexte de stress thérapeutique.

En parallèle de cette investigation, nous chercherons à déterminer les acteurs moléculaires qui, en amont de la voie oncogénique mTORC1-eIF4E, vont régir la formation des GS. Une étude récente (Thiedeck et al, 2013) a mis en évidence que l'inhibition de TSC1-TSC2, complexe protéique régulant l'activité de mTORC1, entraînait une activation de mTORC1, en condition de stress oxydatif. Par contre, l'inhibition de l'hyperactivation de mTORC1 par la protéine astrin, une protéine mitotique impliquée dans la progression du cycle cellulaire, permet le recrutement de Raptor aux GS ; ce qui empêche, in fine, l'induction de l'apoptose. Considérant nos propres résultats, nous testerons si le modèle mis en évidence par Thiedeck et al, peut rejoindre notre modèle d'assemblage des GS médié par mTORC1-eIF4E ; bien que leur travail stipule l'utilisation d'un stress oxydatif sévère (500µM d'Arsenite ou 2mM d'H₂O₂).

De plus, nous déterminerons si le fait de cibler la voie mTORC1-eIF4E-eIF4GI peut aussi sensibiliser les cellules cancéreuses soumises à différents types de thérapies anti-cancer et qui induisent la formation des GS. En 2004, Moeller et collaborateurs ont démontré que la radithérapie pouvait induire la formation des GS. Cependant, le mécanisme de formation de ces GS n'a pas été investigué. Nous pouvons donc tester si notre modèle d'assemblage des GS convient à ce type de stress et observer si l'inhibition de cette voie permet de restaurer l'apoptose au sein des cellules cancéreuses irradiées. En plus du Bortezomib, d'autres agents chimiothérapeutiques, différents du Sorafenib, Celecoxib ou

Lapatinib, seraient capable d'initier la formation des GS (Morita et al, 2012). Il faudra donc définir l'identité des médicaments anti-cancéreux pouvant induire la formation des GS et dont l'assemblage pourrait contribuer à la résistance cellulaire à l'apoptose. Ceci dans le but ultime d'améliorer la qualité de vie du patient et d'adapter sa thérapie anti-cancer, le cas échéant. Enfin, il s'agirait d'identifier les facteurs de survie (tels que fut identifiés l'ARNm de p21) qui sont recrutés et séquestrés dans ces GS en condition de stress chimiothérapeutiques. De cette façon, nous pourrions comprendre la fonction qu'exercent les GS dans le processus de chimiorésistance.

Les futures directions de ce projet permettront devraient aussi définir le rôle exact de la voie mTOR-eIF4E dans la formation des GS induites par Sorafenib Lapatinib. De plus, nous déterminerons le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) exact qui intervient dans le processus de résistance cellulaire associée à la formation des GS induites pas un traitement avec Sorafenib et Lapatinib.

Par la suite, il sera important de déterminer si il existe ou non une action synergique de la voie de formation eIF2 α -phospho-dépendante des GS avec notre modèle impliquant la cascade de signalisation oncogénique mTOR-eIF4E. Dans cet état d'esprit, nous déterminerons les mécanismes moléculaires qui régissent cette synergie. D'ailleurs, une étude démontre un lien direct entre la voie mTOR et la voie de phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . En effet, la kinase PKR, responsable de la phosphorylation d'eIF2 α , peut induire l'activation de la PI3K ce qui entraîne l'activation d'Akt et de mTOR (Kazemi et al, 2006). Ce qui laisse supposer d'une action concomittante et synergique des 2 voies lors de la formation des GS.

Dans ce même ordre d'idée et considérant le rôle de régulateur transcriptionnel/traductionnel que nous avons précédemment ébauché pour la

protéine HRI, il convient de vérifier si cette même kinase ne pourrait pas aussi agir de concert avec la voie mTOR-eIF4E dans le processus de formation des GS.

Dans le futur, il sera pertinent d'identifier la voie de signalisation empruntée par cette kinase pour réguler la taille des cellules. Dans cette optique, l'identification de nouveaux partenaires ou substrats devient primordial. C'est un rôle nouveau qui est ainsi mis en évidence pour la kinase HRI, ici, présente sous sa forme d'activation basale, à savoir son état hypophosphorylé. A date, nous ne connaissons pas encore de fonction associée à cet état d'activation de la kinase HRI.

Enfin, ce projet de doctorat a permis de renforcer l'idée bien établie que les inhibiteurs de mTOR (et donc de sa cascade de signalisation qui en découle) seraient des agents thérapeutiques prometteurs dans le cadre de chimiorésistances impliquant la formation des GS. Il faudrait donc mener un criblage des molécules inhibitrices de mTOR et tester leurs potentiels thérapeutiques dans le cadre de thérapies combinatoires avec des agents chimiothérapeutiques induisant la formation des GS « anti-apoptotiques ».

Pour terminer, on notera que la poursuite de ces travaux est primordiale pour assurer la compréhension des mécanismes de biogénèse des GS, dans le cadre des thérapies anti-cancer, et leur rôle dans le Cancer. La généralisation de notre modèle de formation des GS impliquant la voie de signalisation oncogénique mTORC1-eIF4E permettrait d'utiliser les inhibiteurs de mTOR comme thérapie complémentaire à la chimio ou radio-thérapie, responsable de l'induction de ces GS aux fonctions cellulaires de pro-survie. Il s'agirait, ici, de prévenir la formation de ces granules. Ainsi, les facteurs de survie tels que p21 ne pourraient pas s'y accumuler et la cellule cancéreuse s'engagerait bien dans un processus de mort cellulaire qui la conduirait à sa perte. Dès lors, les études sur les mécanismes d'assemblage des GS présentent un grand potentiel pour l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées, dans le cadre du Cancer.

CHAPITRE 8. Bibliographie

- Acker, M. G., B. S. Shin, et al. (2006). "Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining." J Biol Chem **281**(13): 8469-8475.
- Adams, J. (2002). "Development of the proteasome inhibitor PS-341." Oncologist **7**(1): 9-16.
- Adams, J. (2002). "The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer." Breast Dis **15**: 61-70.
- Adams, J. (2002). "Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy." Trends Mol Med **8**(4 Suppl): S49-54.
- Adams, J. (2002). "Proteasome inhibitors as new anticancer drugs." Curr Opin Oncol **14**(6): 628-634.
- Adams, J. (2004). "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs." Cancer Cell **5**(5): 417-421.
- Adams, J. and M. Kauffman (2004). "Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib)." Cancer Invest **22**(2): 304-311.
- Adnane, J., R. J. Jackson, et al. (2000). "Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model." Oncogene **19**(47): 5338-5347.
- Adnane, L., P. A. Trail, et al. (2006). "Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature." Methods Enzymol **407**: 597-612.
- Alain, T., M. Morita, et al. (2012). "eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies." Cancer Res **72**(24): 6468-6476.
- Alain, T., N. Sonenberg, et al. (2012). "mTOR inhibitor efficacy is determined by the eIF4E/4E-BP ratio." Oncotarget **3**(12): 1491-1492.
- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, (2008) Molecular Biology of the Cell, 5th. Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Alessi, D. R., L. R. Pearce, et al. (2009). "New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond." Sci Signal **2**(67): pe27.
- Algire, M. A., D. Maag, et al. (2005). "Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation." Mol Cell **20**(2): 251-262.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2002). "Stressful initiations." J Cell Sci **115**(Pt 16): 3227-3234.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2002). "Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation." Cell Stress Chaperones **7**(2): 213-221.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2008). "Stress granules: The Tao of RNA triage." Trends in Biochemical Sciences **33**(3): 141-150.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2009). "RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(6): 430-436.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2009). "Stress granules." Curr Biol **19**(10): R397-398.
- Andrade, M. A. and P. Bork (1995). "HEAT repeats in the Huntington's disease protein." Nat Genet **11**(2): 115-116.

- Antar, L. N., J. B. DICTENBERG, et al. (2005). "Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons." *Genes Brain Behav* **4**(6): 350-359.
- Anthony, B., P. Carter, et al. (1996). "Overexpression of the proto-oncogene/translation factor 4E in breast-carcinoma cell lines." *Int J Cancer* **65**(6): 858-863.
- Arimoto, K., H. Fukuda, et al. (2008). "Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways." *Nat Cell Biol* **10**(11): 1324-1332.
- Arimoto, K., H. Fukuda, et al. (2008). "Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways." *Nat Cell Biol* **10**(11): 1324-1332.
- Armengol, G., F. Rojo, et al. (2007). "4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications." *Cancer Res* **67**(16): 7551-7555.
- Asada, M., T. Yamada, et al. (1999). "Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation." *EMBO J* **18**(5): 1223-1234.
- Asano, K., J. Clayton, et al. (2000). "A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo." *Genes Dev* **14**(19): 2534-2546.
- Asher, G., P. Tsvetkov, et al. (2005). "A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73." *Genes Dev* **19**(3): 316-321.
- Avdulov, S., S. Li, et al. (2004). "Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells." *Cancer Cell* **5**(6): 553-563.
- Averous, J. and C. G. Proud (2006). "When translation meets transformation: the mTOR story." *Oncogene* **25**(48): 6423-6435.
- Azar, R., A. Alard, et al. (2009). "4E-BP1 is a target of Smad4 essential for TGFbeta-mediated inhibition of cell proliferation." *EMBO J* **28**(22): 3514-3522.
- Baguet, A., S. Degot, et al. (2007). "The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly." *J Cell Sci* **120**(Pt 16): 2774-2784.
- Baltzis, D., O. Pluquet, et al. (2007). "The eIF2alpha kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53." *J Biol Chem* **282**(43): 31675-31687.
- Banerjee, D. and A. Liefshitz (2001). "Potential of the proteasomal inhibitor MG-132 as an anticancer agent, alone and in combination." *Anticancer Res* **21**(6A): 3941-3947.

- Bauer, B. N., M. Rafie-Kolpin, et al. (2001). "Multiple autophosphorylation is essential for the formation of the active and stable homodimer of heme-regulated eIF2 α kinase." *Biochemistry* **40**(38): 11543-11551.
- Baus, F., V. Gire, et al. (2003). "Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts." *EMBO J* **22**(15): 3992-4002.
- Baxter, R., V. C. Knell, et al. (1973). "Effect of MDMP on protein synthesis in wheat and bacteria." *Nat New Biol* **243**(126): 139-142.
- Berlanga, J. J., S. Herrero, et al. (1998). "Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2 α kinase from mouse nonerythroid cells." *J Biol Chem* **273**(48): 32340-32346.
- Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." *Physiol Rev* **79**(4): 1127-1155.
- Bilancia, D., G. Rosati, et al. (2007). "Lapatinib in breast cancer." *Ann Oncol* **18 Suppl 6**: vi26-30.
- Blackwell, K. L., H. J. Burstein, et al. (2010). "Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **28**(7): 1124-1130.
- Bordeleau, M. E., A. Mori, et al. (2006). "Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A." *Nat Chem Biol* **2**(4): 213-220.
- Bosco, D. A. and J. E. Landers (2010). "Genetic determinants of amyotrophic lateral sclerosis as therapeutic targets." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**(6): 779-790.
- Bosco, D. A., N. Lemay, et al. (2010). "Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules." *Hum Mol Genet* **19**(21): 4160-4175.
- Bosotti, R., A. Isacchi, et al. (2000). "FAT: a novel domain in PIK-related kinases." *Trends Biochem Sci* **25**(5): 225-227.
- Bourdic, A., E. Calvo, et al. (2013). "Transcriptome analysis reveals new insights into the modulation of endometrial stromal cell receptive phenotype by embryo-derived signals interleukin-1 and human chorionic gonadotropin: possible involvement in early embryo implantation." *PLoS One* **8**(5): e64829.
- Bove, J., M. Martinez-Vicente, et al. (2011). "Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights." *Nat Rev Neurosci* **12**(8): 437-452.
- Bragado, P., Y. Estrada, et al. (2012). "Analysis of marker-defined HNSCC subpopulations reveals a dynamic regulation of tumor initiating properties." *PLoS One* **7**(1): e29974.
- Buchan, J. R., L. S. Aucott, et al. (2006). "tRNA properties help shape codon pair preferences in open reading frames." *Nucleic Acids Res* **34**(3): 1015-1027.
- Buchan, J. R., A. P. Capaldi, et al. (2012). "TOR-tured yeast find a new way to stand the heat." *Mol Cell* **47**(2): 155-157.
- Buchan, J. R., R. M. Kolaitis, et al. (2013). Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. 153 Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Buchan, J. R., R. M. Kolaitis, et al. (2013). "Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function." *Cell* **153**(7): 1461-1474.

- Buchan, J. R., D. Muhlrad, et al. (2008). "P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **183**(3): 441-455.
- Buchan, J. R., T. Nissan, et al. (2010). "Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*." *Methods Enzymol* **470**: 619-640.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2007). "Molecular biology. The two faces of miRNA." *Science* **318**(5858): 1877-1878.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." *Mol Cell* **36**(6): 932-941.
- Buchan, J. R. and I. Stansfield (2007). "Halting a cellular production line: responses to ribosomal pausing during translation." *Biol Cell* **99**(9): 475-487.
- Buchan, J. R., J. H. Yoon, et al. (2011). "Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* **124**(Pt 2): 228-239.
- Cabal-Hierro, L. and P. S. Lazo (2012). "Signal transduction by tumor necrosis factor receptors." *Cell Signal* **24**(6): 1297-1305.
- Caravita, T., P. de Fabritiis, et al. (2006). "Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies." *Nat Clin Pract Oncol* **3**(7): 374-387.
- Carriere, A., M. Cargnello, et al. (2008). "Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation." *Curr Biol* **18**(17): 1269-1277.
- Carriere, A., H. Ray, et al. (2008). "The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade." *Front Biosci* **13**: 4258-4275.
- Castellvi, J., A. Garcia, et al. (2006). "Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer." *Cancer* **107**(8): 1801-1811.
- Chang, Y. S., J. Adnane, et al. (2007). "Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models." *Cancer Chemother Pharmacol* **59**(5): 561-574.
- Chaparro, M., L. Gonzalez Moreno, et al. (2008). "Review article: pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents." *Aliment Pharmacol Ther* **28**(11-12): 1269-1277.
- Charrier-Savournin, F. B., M. T. Chateau, et al. (2004). "p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress." *Mol Biol Cell* **15**(9): 3965-3976.
- Chefalo, P. J., J. Oh, et al. (1998). "Heme-regulated eIF-2alpha kinase purifies as a hemoprotein." *Eur J Biochem* **258**(2): 820-830.
- Chefalo, P. J., J. M. Yang, et al. (1994). "Inhibition of protein synthesis in insect cells by baculovirus-expressed heme-regulated eIF-2 alpha kinase." *J Biol Chem* **269**(41): 25788-25794.
- Chen, J. J. (2007). "Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias." *Blood* **109**(7): 2693-2699.

- Chen, K. F., H. L. Chen, et al. (2011). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells." J Pharmacol Exp Ther **337**(1): 155-161.
- Chen, L., B. H. Aktas, et al. (2012). "Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation." Oncotarget **3**(8): 869-881.
- Chen, J.-J., Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. and Mathews, M.B. (2000) Heme-regulated eIF-2a kinase. Translational Control of Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 529±546.
- Clemens, M. J. (2004). "Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation." Oncogene **23**(18): 3180-3188.
- Clemens, M. J. and U. A. Bommer (1999). "Translational control: the cancer connection." Int J Biochem Cell Biol **31**(1): 1-23.
- Clemens, M.J., Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. and Mathews, M.B. (1996) Protein kinases that phosphorylate eIF-2 and eIF-2B and their role in eukaryotic cell translational control. Translational Control of Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139±172.
- Codony-Servat, J., M. A. Tapia, et al. (2006). "Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells." Mol Cancer Ther **5**(3): 665-675.
- Coldwell, M. J. and S. J. Morley (2006). "Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity." Mol Cell Biol **26**(22): 8448-8460.
- Collier, N. C., J. Heuser, et al. (1988). "Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts." J Cell Biol **106**(4): 1131-1139.
- Crawford, L. J., B. Walker, et al. (2011). "Proteasome inhibitors in cancer therapy." J Cell Commun Signal **5**(2): 101-110.
- Crosby, J. S., P. J. Chefalo, et al. (2000). "Regulation of hemoglobin synthesis and proliferation of differentiating erythroid cells by heme-regulated eIF-2alpha kinase." Blood **96**(9): 3241-3248.
- Crosby, J. S., K. Lee, et al. (1994). "Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase." Mol Cell Biol **14**(6): 3906-3914.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, et al. (2005). "eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR." J Cell Biol **169**(2): 245-256.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, et al. (2006). "eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation." J Cell Biol **175**(3): 415-426.
- Dai, Y., M. Rahmani, et al. (2003). "Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process." Oncogene **22**(46): 7108-7122.
- Damgaard, C. K. and J. Lykke-Andersen (2011). "Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR." Genes Dev **25**(19): 2057-2068.
- Das, S., T. Maiti, et al. (1997). "Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) with the beta-subunit of eIF2." J Biol Chem **272**(50): 31712-31718.
- Defatta, R. J. and A. De Benedetti (2003). "Translational upregulation of yes accompanies eIF4E-mediated oncogenic transformation." Int J Oncol **23**(6): 1709-1713.

- DeGracia, D. J., J. A. Rafols, et al. (2006). "Immunohistochemical mapping of total and phosphorylated eukaryotic initiation factor 4G in rat hippocampus following global brain ischemia and reperfusion." Neuroscience **139**(4): 1235-1248.
- Dever, T. E. (1999). "Translation initiation: adept at adapting." Trends Biochem Sci **24**(10): 398-403.
- Di Marco, S., A. Cammas, et al. (2012). "The translation inhibitor pateamine A prevents cachexia-induced muscle wasting in mice." Nat Commun **3**: 896.
- Di Marco, S., Z. Hel, et al. (2001). "Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNFalpha mRNA impairs binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNFalpha mRNA." Nucleic Acids Res **29**(4): 863-871.
- Dormann, D., R. Rodde, et al. (2010). "ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import." EMBO J **29**(16): 2841-2857.
- Dowling, R. J., I. Topisirovic, et al. (2010). "Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors." Biochim Biophys Acta **1804**(3): 433-439.
- Dua, K., T. M. Williams, et al. (2001). "Translational control of the proteome: relevance to cancer." Proteomics **1**(10): 1191-1199.
- Dunlop, E. A. and A. R. Tee (2009). "Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms." Cell Signal **21**(6): 827-835.
- Eisinger-Mathason, T. S., J. Andrade, et al. (2008). "Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival." Mol Cell **31**(5): 722-736.
- Elden, A. C., H. J. Kim, et al. (2010). "Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS." Nature **466**(7310): 1069-1075.
- El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology **132**(7): 2557-2576.
- Emara, M. M. and M. A. Brinton (2007). "Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(21): 9041-9046.
- Esclatine, A., B. Taddeo, et al. (2004). "Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs." J Virol **78**(16): 8582-8592.
- Fagard, R. and I. M. London (1981). "Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 866-870.

- Farny, N. G., N. L. Kedersha, et al. (2009). "Metazoan stress granule assembly is mediated by P-eIF2alpha-dependent and -independent mechanisms." RNA **15**(10): 1814-1821.
- Feldman, M. E., B. Apsel, et al. (2009). "Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2." PLoS Biol **7**(2): e38.
- Feng, F. Y., S. Varambally, et al. (2007). "Role of epidermal growth factor receptor degradation in gemcitabine-mediated cytotoxicity." Oncogene **26**(23): 3431-3439.
- Fingar, D. C. and J. Blenis (2004). "Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression." Oncogene **23**(18): 3151-3171.
- Fingar, D. C., C. J. Richardson, et al. (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E." Mol Cell Biol **24**(1): 200-216.
- Fletcher, C. M. and G. Wagner (1998). "The interaction of eIF4E with 4E-BP1 is an induced fit to a completely disordered protein." Protein Sci **7**(7): 1639-1642.
- Fournier, M. J., C. Gareau, et al. (2010). "The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules." Cancer Cell Int **10**: 12.
- Fraser, C. S. and J. A. Doudna (2007). "Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation." Nat Rev Microbiol **5**(1): 29-38.
- Fraser, C. S., J. Y. Lee, et al. (2004). "The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro." J Biol Chem **279**(10): 8946-8956.
- Fujimura, K., J. Katahira, et al. (2009). "Microscopic dissection of the process of stress granule assembly." Biochim Biophys Acta **1793**(11): 1728-1737.
- Fujimura, K., A. T. Sasaki, et al. (2012). "Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules." Nucleic Acids Res **40**(16): 8099-8110.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, et al. (2000). "HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3073-3078.
- Gardner, L. B. (2008). "Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response." Mol Cell Biol **28**(11): 3729-3741.
- Gardner, L. B. and P. G. Corn (2008). "Hypoxic regulation of mRNA expression." Cell Cycle **7**(13): 1916-1924.
- Gareau, C., M. J. Fournier, et al. (2011). "p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis." PLoS One **6**(5): e20254.
- Gareau, C., E. Houssin, et al. (2013). "Characterization of fragile X mental retardation protein recruitment and dynamics in Drosophila stress granules." PLoS One **8**(2): e55342.
- Gareau, C., D. Martel, et al. (2013). "Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in Drosophila." Biol Open **2**(1): 68-81.

- Gartel, A. L., M. S. Serfas, et al. (1996). "p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line." *Exp Cell Res* **227**(2): 171-181.
- Gartel, A. L., M. S. Serfas, et al. (1996). "p21--negative regulator of the cell cycle." *Proc Soc Exp Biol Med* **213**(2): 138-149.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." *Mol Cancer Ther* **1**(8): 639-649.
- Gedaly, R., P. Angulo, et al. (2012). "PKI-587 and sorafenib targeting PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK pathways synergistically inhibit HCC cell proliferation." *J Surg Res* **176**(2): 542-548.
- Geyer, C. E., J. Forster, et al. (2006). "Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer." *N Engl J Med* **355**(26): 2733-2743.
- Gibson, T. J. (2012). "RACK1 research - ships passing in the night?" *FEBS Lett* **586**(17): 2787-2789.
- Gilmore, T. D. and M. Herscovitch (2006). "Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting." *Oncogene* **25**(51): 6887-6899.
- Gingras, A. C., S. P. Gygi, et al. (1999). "Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism." *Genes Dev* **13**(11): 1422-1437.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes Dev* **15**(7): 807-826.
- Gloesenkamp, C. R., B. Nitzsche, et al. (2012). "AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." *Int J Oncol* **40**(3): 876-888.
- Goggin, K., S. Beaudoin, et al. (2008). "Prion protein aggregates are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response." *Biochim Biophys Acta* **1783**(3): 479-491.
- Gomez, H. L., D. C. Doval, et al. (2008). "Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **26**(18): 2999-3005.
- Goodfellow, I. G. and L. O. Roberts (2008). "Eukaryotic initiation factor 4E." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12): 2675-2680.
- Gosselin, P., N. Oulhen, et al. (2011). "The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E: new structural insights by SAXS." *Nucleic Acids Res* **39**(8): 3496-3503.
- Goulet, I., S. Boisvenue, et al. (2008). "TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules." *Hum Mol Genet* **17**(19): 3055-3074.
- Gradi, A., H. Imataka, et al. (1998). "A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G." *Mol Cell Biol* **18**(1): 334-342.

- Graff, J. R., B. W. Konicek, et al. (2008). "Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy." *Cancer Res* **68**(3): 631-634.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, et al. (2007). "Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity." *J Clin Invest* **117**(9): 2638-2648.
- Grayzel, A. I., P. Horchner, et al. (1966). "The stimulation of globin synthesis by heme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(3): 650-655.
- Groll, M., C. R. Berkers, et al. (2006). "Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome." *Structure* **14**(3): 451-456.
- Gross, J. D., N. J. Moerke, et al. (2003). "Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E." *Cell* **115**(6): 739-750.
- Grosso, S., E. Pesce, et al. (2011). "Sensitivity of global translation to mTOR inhibition in REN cells depends on the equilibrium between eIF4E and 4E-BP1." *PLoS One* **6**(12): e29136.
- Groves, M. R., N. Hanlon, et al. (1999). "The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs." *Cell* **96**(1): 99-110.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The pharmacology of mTOR inhibition." *Sci Signal* **2**(67): pe24.
- Guo, B., S. H. Yang, et al. (2007). "Signalling pathways and the regulation of SUMO modification." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 6): 1414-1418.
- Haghighat, A., S. Mader, et al. (1995). "Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E." *EMBO J* **14**(22): 5701-5709.
- Haghighat, A. and N. Sonenberg (1997). "eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure." *J Biol Chem* **272**(35): 21677-21680.
- Haghighat, A., Y. Svitkin, et al. (1996). "The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase." *J Virol* **70**(12): 8444-8450.
- Han, A. P., C. Yu, et al. (2001). "Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency." *EMBO J* **20**(23): 6909-6918.
- Han, T. W., M. Kato, et al. (2012). "Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies." *Cell* **149**(4): 768-779.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hara, K., Y. Maruki, et al. (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." *Cell* **110**(2): 177-189.
- Harvey Lodish; Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott, (2012) *Molecular Cell Biology-7th edition*, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* **18**(16): 1926-1945.

- He, H., T. von der Haar, et al. (2003). "The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection." *Mol Cell Biol* **23**(15): 5431-5445.
- Hentze, M. W. (1997). "eIF4G: a multipurpose ribosome adapter?" *Science* **275**(5299): 500-501.
- Hershko, A. (2005). "The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle." *Cell Death Differ* **12**(9): 1191-1197.
- Hideshima, T., D. Chauhan, et al. (2001). "Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment." *Semin Oncol* **28**(6): 607-612.
- Hideshima, T., P. Richardson, et al. (2001). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells." *Cancer Res* **61**(7): 3071-3076.
- Hilliker, A., Z. Gao, et al. (2011). "The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex." *Mol Cell* **43**(6): 962-972.
- Holcik, M. and N. Sonenberg (2005). "Translational control in stress and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 318-327.
- Hsieh, A. C., M. Costa, et al. (2010). "Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E." *Cancer Cell* **17**(3): 249-261.
- Hsieh, A. C., Y. Liu, et al. (2012). "The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis." *Nature* **485**(7396): 55-61.
- Hsieh, A. C. and D. Ruggero (2010). "Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer." *Clin Cancer Res* **16**(20): 4914-4920.
- Huang, S., M. A. Bjornsti, et al. (2003). "Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance." *Cancer Biol Ther* **2**(3): 222-232.
- Huang, S. and P. J. Houghton (2003). "Targeting mTOR signaling for cancer therapy." *Curr Opin Pharmacol* **3**(4): 371-377.
- Iborra, F. J., D. A. Jackson, et al. (2001). "Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells." *Science* **293**(5532): 1139-1142.
- Igarashi, J., T. Sasaki, et al. (2011). "Autophosphorylation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase and the role of the modification in catalysis." *FEBS J* **278**(6): 918-928.
- Imajoh-Ohmi, S., T. Kawaguchi, et al. (1995). "Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **217**(3): 1070-1077.
- Imataka, H., A. Gradi, et al. (1998). "A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation." *EMBO J* **17**(24): 7480-7489.
- Inoki, K., M. N. Corradetti, et al. (2005). "Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease." *Nat Genet* **37**(1): 19-24.

- Iwata, H. (2007). "Perspective of trastuzumab treatment." Breast Cancer **14**(2): 150-155.
- Jacinto, E., R. Loewith, et al. (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." Nat Cell Biol **6**(11): 1122-1128.
- Jackson, G., H. Einsele, et al. (2005). "Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies." Cancer Treat Rev **31**(8): 591-602.
- Jackson, R. J. (2005). "Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1231-1241.
- Jackson, R. J., C. U. Hellen, et al. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(2): 113-127.
- Jagannath, S. (2005). "Treatment of myeloma in patients not eligible for transplantation." Curr Treat Options Oncol **6**(3): 241-253.
- Jagannath, S., B. Barlogie, et al. (2005). "Bortezomib in recurrent and/or refractory multiple myeloma. Initial clinical experience in patients with impaired renal function." Cancer **103**(6): 1195-1200.
- Janus, A., T. Robak, et al. (2005). "The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy." Cell Mol Biol Lett **10**(3): 479-498.
- Jegg, A. M., T. M. Ward, et al. (2012). "PI3K independent activation of mTORC1 as a target in lapatinib-resistant ERBB2+ breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **136**(3): 683-692.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Johnston, S., J. Pippen, Jr., et al. (2009). "Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer." J Clin Oncol **27**(33): 5538-5546.
- Johnston, S. R. and A. Leary (2006). "Lapatinib: a novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer." Drugs Today (Barc) **42**(7): 441-453.
- Jones, R. M., J. Branda, et al. (1996). "An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc." Mol Cell Biol **16**(9): 4754-4764.
- Joshi, B., K. Lee, et al. (2005). "Phylogenetic analysis of eIF4E-family members." BMC Evol Biol **5**: 48.
- Jud, M. C., M. J. Czerwinski, et al. (2008). "Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway." Dev Biol **318**(1): 38-51.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation." Annu Rev Biochem **73**: 657-704.
- Kato, M., T. W. Han, et al. (2012). "Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels." Cell **149**(4): 753-767.
- Kaufman, B., M. Trudeau, et al. (2009). "Lapatinib monotherapy in patients with HER2-overexpressing relapsed or refractory inflammatory breast cancer:

- final results and survival of the expanded HER2+ cohort in EGF103009, a phase II study." *Lancet Oncol* **10**(6): 581-588.
- Kayali, F., H. L. Montie, et al. (2005). "Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules." *Neuroscience* **134**(4): 1223-1245.
- Kazemi, S., Z. Mounir, et al. (2007). "A novel function of eIF2alpha kinases as inducers of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathway." *Mol Biol Cell* **18**(9): 3635-3644.
- Kedersha, N. and P. Anderson (2002). "Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 963-969.
- Kedersha, N. and P. Anderson (2007). "Mammalian stress granules and processing bodies." *Methods Enzymol* **431**: 61-81.
- Kedersha, N. and P. Anderson (2009). "Regulation of translation by stress granules and processing bodies." *Prog Mol Biol Transl Sci* **90**: 155-185.
- Kedersha, N., S. Chen, et al. (2002). "Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules." *Mol Biol Cell* **13**(1): 195-210.
- Kedersha, N., M. R. Cho, et al. (2000). "Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules." *J Cell Biol* **151**(6): 1257-1268.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, et al. (2005). "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling." *J Cell Biol* **169**(6): 871-884.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, et al. (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." *J Cell Biol* **147**(7): 1431-1442.
- Kevil, C. G., A. De Benedetti, et al. (1996). "Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis." *Int J Cancer* **65**(6): 785-790.
- Khandjian, E. W., M. E. Huot, et al. (2004). "Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13357-13362.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, et al. (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." *Cell* **110**(2): 163-175.
- Kim, W. J., S. H. Back, et al. (2005). "Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions." *Mol Cell Biol* **25**(6): 2450-2462.
- Kim, Y. S., S. A. Nedospasov, et al. (2005). "TRAF2 plays a key, nonredundant role in LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling." *Mol Cell Biol* **25**(6): 2130-2137.

- Kimball, S. R., R. L. Horetsky, et al. (2003). "Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C273-284.
- Knowles and Shelby, (2005) Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer-4th edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Kolobova, E., A. Efimov, et al. (2009). "Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules." Exp Cell Res **315**(3): 542-555.
- Komar, A. A. and M. Hatzoglou (2011). "Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states." Cell Cycle **10**(2): 229-240.
- Kondagunta, G. V., B. Drucker, et al. (2004). "Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma." J Clin Oncol **22**(18): 3720-3725.
- Konecny, G. E., M. D. Pegram, et al. (2006). "Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells." Cancer Res **66**(3): 1630-1639.
- Konicek, B. W., C. A. Dumstorf, et al. (2008). "Targeting the eIF4F translation initiation complex for cancer therapy." Cell Cycle **7**(16): 2466-2471.
- Korneeva, N. L., B. J. Lamphear, et al. (2000). "Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1." J Biol Chem **275**(52): 41369-41376.
- Koromilas, A. E., A. Lazaris-Karatzas, et al. (1992). "mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E." EMBO J **11**(11): 4153-4158.
- Kramer, G., J. M. Cimadevilla, et al. (1976). "Specificity of the protein kinase activity associated with the hemin-controlled repressor of rabbit reticulocyte." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(9): 3078-3082.
- Kramer, S., R. Queiroz, et al. (2008). "Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169." J Cell Sci **121**(Pt 18): 3002-3014.
- Krappmann, D., F. G. Wulczyn, et al. (1996). "Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo." EMBO J **15**(23): 6716-6726.
- Kwon, S., Y. Zhang, et al. (2007). "The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response." Genes Dev **21**(24): 3381-3394.
- Lamphear, B. J., R. Kirchweger, et al. (1995). "Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation." J Biol Chem **270**(37): 21975-21983.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR Signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(2).
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- Larsson, O., M. Morita, et al. (2012). "Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(23): 8977-8982.

- Lazaris-Karatzas, A., K. S. Montine, et al. (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." Nature **345**(6275): 544-547.
- Lazaris-Karatzas, A. and N. Sonenberg (1992). "The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts." Mol Cell Biol **12**(3): 1234-1238.
- Lee, J. E., J. Y. Lee, et al. (2010). "Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells." PLoS One **5**(6): e11201.
- Legon, S., R. J. Jackson, et al. (1973). "Control of protein synthesis in reticulocyte lysates by haemin." Nat New Biol **241**(109): 150-152.
- Levin, D., R. S. Ranu, et al. (1976). "Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: phosphorylation of methionyl-tRNA^f binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from hemedeficient lysates." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(9): 3112-3116.
- Li, B. D., L. Liu, et al. (1997). "Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma." Cancer **79**(12): 2385-2390.
- Li, Y., R. DeFatta, et al. (2001). "A translationally regulated Toubled kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed." Oncogene **20**(6): 726-738.
- Lin, N. U., L. A. Carey, et al. (2008). "Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer." J Clin Oncol **26**(12): 1993-1999.
- Lin, T. A., X. Kong, et al. (1994). "PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation." Science **266**(5185): 653-656.
- Lind, D. S., S. N. Hochwald, et al. (2001). "Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer." Surgery **130**(2): 363-369.
- Linder, B., O. Plottner, et al. (2008). "Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP." Hum Mol Genet **17**(20): 3236-3246.
- Lindqvist, L. and J. Pelletier (2009). "Inhibitors of translation initiation as cancer therapeutics." Future Med Chem **1**(9): 1709-1722.
- Liu, L., Y. Cao, et al. (2006). "Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5." Cancer Res **66**(24): 11851-11858.
- Liu, Q., C. Thoreen, et al. (2009). "mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery." Drug Discov Today Ther Strateg **6**(2): 47-55.
- Liu, S., W. R. Bishop, et al. (2003). "Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy." Drug Resist Updat **6**(4): 183-195.

- Liu, T., R. Yacoub, et al. (2011). "Combinatorial effects of lapatinib and rapamycin in triple-negative breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* **10**(8): 1460-1469.
- Liu, Y., R. T. Poon, et al. (2007). "Blockage of epidermal growth factor receptor by quinazoline tyrosine kinase inhibitors suppresses growth of human hepatocellular carcinoma." *Cancer Lett* **248**(1): 32-40.
- Liu-Yesucevitz, L., A. Bilgutay, et al. (2010). "Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue." *PLoS One* **5**(10): e13250.
- Llovet, J. M. and J. Bruix (2008). "Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **48**(4): 1312-1327.
- Low, W. K., Y. Dang, et al. (2005). "Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A." *Mol Cell* **20**(5): 709-722.
- Lu, L., A. P. Han, et al. (2001). "Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses." *Mol Cell Biol* **21**(23): 7971-7980.
- Lynch, M., C. Fitzgerald, et al. (2004). "Activated eIF4E-binding protein slows G1 progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth." *J Biol Chem* **279**(5): 3327-3339.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318.
- Mader, S., H. Lee, et al. (1995). "The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins." *Mol Cell Biol* **15**(9): 4990-4997.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, et al. (2006). "mTOR, translation initiation and cancer." *Oncogene* **25**(48): 6416-6422.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, et al. (2007). "Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation." *PLoS One* **2**(2): e242.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, et al. (2004). "eIF4E--from translation to transformation." *Oncogene* **23**(18): 3172-3179.
- Mangiardi, D. A., K. McLaughlin-Williamson, et al. (2004). "Progression of hair cell ejection and molecular markers of apoptosis in the avian cochlea following gentamicin treatment." *J Comp Neurol* **475**(1): 1-18.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1997). "Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." *Cell* **89**(6): 951-961.
- Martineau, Y., R. Azar, et al. (2013). "Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins." *Oncogene* **32**(6): 671-677.
- Matsuo, H., H. Li, et al. (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein." *Nat Struct Biol* **4**(9): 717-724.
- Mazroui, R., S. Di Marco, et al. (2007). "Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation." *Mol Biol Cell* **18**(7): 2603-2618.
- Mazroui, R., M. E. Huot, et al. (2003). "Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs." *Hum Mol Genet* **12**(23): 3087-3096.

- Mazroui, R., M. E. Huot, et al. (2002). "Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression." *Hum Mol Genet* **11**(24): 3007-3017.
- Mazroui, R., R. Sukarieh, et al. (2006). "Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation." *Mol Biol Cell* **17**(10): 4212-4219.
- McArthur, H. (2009). "An overview of HER-targeted therapy with lapatinib in breast cancer." *Adv Ther* **26**(3): 263-271.
- McConkey, D. J. and K. Zhu (2008). "Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer." *Drug Resist Updat* **11**(4-5): 164-179.
- McEwen, E., N. Kedersha, et al. (2005). "Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure." *J Biol Chem* **280**(17): 16925-16933.
- McInerney, G. M., N. L. Kedersha, et al. (2005). "Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation." *Mol Biol Cell* **16**(8): 3753-3763.
- McWhorter, M. L., U. R. Monani, et al. (2003). "Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding." *J Cell Biol* **162**(5): 919-931.
- Mendez-Sanchez, N., F. Vasquez-Fernandez, et al. (2008). "Sorafenib, a systemic therapy for hepatocellular carcinoma." *Ann Hepatol* **7**(1): 46-51.
- Meric, F. and K. K. Hunt (2002). "Translation initiation in cancer: a novel target for therapy." *Mol Cancer Ther* **1**(11): 971-979.
- Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, et al. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications." *Blood* **101**(6): 2377-2380.
- Mizuno, A., Y. In, et al. (2008). "Importance of C-terminal flexible region of 4E-binding protein in binding with eukaryotic initiation factor 4E." *FEBS Lett* **582**(23-24): 3439-3444.
- Moeller, B. J., Y. Cao, et al. (2004). "Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules." *Cancer Cell* **5**(5): 429-441.
- Moeller, B. J. and M. W. Dewhirst (2004). "Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity." *Cell Cycle* **3**(9): 1107-1110.
- Moerke, N. J., H. Aktas, et al. (2007). "Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G." *Cell* **128**(2): 257-267.
- Mokas, S., J. R. Mills, et al. (2009). "Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition." *Mol Biol Cell* **20**(11): 2673-2683.
- Monani, U. R. (2005). "Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease." *Neuron* **48**(6): 885-896.

- Montemurro, F., G. Valabrega, et al. (2007). "Lapatinib: a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase activity." Expert Opin Biol Ther **7**(2): 257-268.
- Montie, H. L., A. J. Haezebrouck, et al. (2005). "PERK is activated differentially in peripheral organs following cardiac arrest and resuscitation." Resuscitation **66**(3): 379-389.
- Montie, H. L., F. Kayali, et al. (2005). "Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK." Biochim Biophys Acta **1741**(3): 314-324.
- Morita, T., R. Satoh, et al. (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**(1): 399-403.
- Morley, S. J., P. S. Curtis, et al. (1997). "eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets." RNA **3**(10): 1085-1104.
- Morley, S. J. and J. A. Traugh (1989). "Phorbol esters stimulate phosphorylation of eukaryotic initiation factors 3, 4B, and 4F." J Biol Chem **264**(5): 2401-2404.
- Mounir, Z., J. L. Krishnamoorthy, et al. (2009). "Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2alpha phosphorylation pathway." Sci Signal **2**(102): ra85.
- Moy, B. and P. E. Goss (2006). "Lapatinib: current status and future directions in breast cancer." Oncologist **11**(10): 1047-1057.
- Moy, B., P. Kirkpatrick, et al. (2007). "Lapatinib." Nat Rev Drug Discov **6**(6): 431-432.
- Mujtaba, T. and Q. P. Dou (2011). "Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib." Discov Med **12**(67): 471-480.
- Murata, T. and K. Shimotohno (2006). "Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E." J Biol Chem **281**(30): 20788-20800.
- Murphy, K. M. (2006). "Stress management for T helper differentiation." Nat Immunol **7**(6): 553-555.
- Nahta, R. and F. J. Esteva (2003). "HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions." Clin Cancer Res **9**(14): 5078-5084.
- Nahta, R., L. X. Yuan, et al. (2007). "Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling." Mol Cancer Ther **6**(2): 667-674.
- Nathan, C. O., N. Amirghahari, et al. (2004). "Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway." Clin Cancer Res **10**(17): 5820-5827.
- Nathan, C. O., N. Amirghahari, et al. (2007). "Mammalian target of rapamycin inhibitors as possible adjuvant therapy for microscopic residual disease in head and neck squamous cell cancer." Cancer Res **67**(5): 2160-2168.
- Naujokat, C., O. Sezer, et al. (2000). "Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells." Eur J Haematol **65**(4): 221-236.
- Neufeld, T. P. (2010). "TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 157-168.

- Nielsen, D. L., M. Andersson, et al. (2009). "HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors." Cancer Treat Rev **35**(2): 121-136.
- Nonhoff, U., M. Ralser, et al. (2007). "Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules." Mol Biol Cell **18**(4): 1385-1396.
- Nover, L., K. D. Scharf, et al. (1983). "Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves." Mol Cell Biol **3**(9): 1648-1655.
- Nowell PC (1976) Science. Oct 1;194(4260):23-8.
- Ohn, T., N. Kedersha, et al. (2008). "A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly." Nat Cell Biol **10**(10): 1224-1231.
- Oridate, N., H. J. Kim, et al. (2005). "Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin." Cancer Biol Ther **4**(3): 318-323.
- Pain, V. M. (1996). "Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells." Eur J Biochem **236**(3): 747-771.
- Paku, K. S., Y. Umenaga, et al. (2012). "A conserved motif within the flexible C-terminus of the translational regulator 4E-BP is required for tight binding to the mRNA cap-binding protein eIF4E." Biochem J **441**(1): 237-245.
- Papandreou, C. N. and C. J. Logothetis (2004). "Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer." Cancer Res **64**(15): 5036-5043.
- Parkin, D. M., F. I. Bray, et al. (2001). "Cancer burden in the year 2000. The global picture." Eur J Cancer **37 Suppl 8**: S4-66.
- Patel, J., L. E. McLeod, et al. (2002). "Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors." Eur J Biochem **269**(12): 3076-3085.
- Pause, A., G. J. Belsham, et al. (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." Nature **371**(6500): 762-767.
- Peterson, T. R., M. Laplante, et al. (2009). "DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival." Cell **137**(5): 873-886.
- Petitclerc, E., R. G. Deschesnes, et al. (2004). "Antiangiogenic and antitumoral activity of phenyl-3-(2-chloroethyl)ureas: a class of soft alkylating agents disrupting microtubules that are unaffected by cell adhesion-mediated drug resistance." Cancer Res **64**(13): 4654-4663.
- Petroulakis, E., Y. Mamane, et al. (2006). "mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy." Br J Cancer **94**(2): 195-199.

- Poulin, F., A. C. Gingras, et al. (1998). "4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family." *J Biol Chem* **273**(22): 14002-14007.
- Philippe Pourquier. (November 2011). Agents alkylants. *Bulletin du Cancer*. Volume 98, Numéro 11, 1237-51.
- Prevot, D., D. Decimo, et al. (2003). "Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning." *EMBO J* **22**(8): 1909-1921.
- Pyronnet, S. (2000). "Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1." *Biochem Pharmacol* **60**(8): 1237-1243.
- Rafie-Kolpin, M., A. P. Han, et al. (2003). "Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2alpha kinase activity of HRI." *Biochemistry* **42**(21): 6536-6544.
- Rahmani, M., E. M. Davis, et al. (2007). "The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* **27**(15): 5499-5513.
- Rajkumar, S. V., P. G. Richardson, et al. (2005). "Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer." *J Clin Oncol* **23**(3): 630-639.
- Rajyaguru, P., M. She, et al. (2012). "Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins." *Mol Cell* **45**(2): 244-254.
- Ranum, L. P. and T. A. Cooper (2006). "RNA-mediated neuromuscular disorders." *Annu Rev Neurosci* **29**: 259-277.
- Raught B. G. A. (2007). "Signaling to translation Initiation." *Cold Spring Harbor Laboratory Press* : 346-400.
- Ribatti, D., B. Nico, et al. (2013). "B16-F10 melanoma cells contribute to the new formation of blood vessels in the chick embryo chorioallantoic membrane through vasculogenic mimicry." *Clin Exp Med* **13**(2): 143-147.
- Richardson, P. G. (2004). "A review of the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma." *Expert Opin Pharmacother* **5**(6): 1321-1331.
- Richardson, P. G. and K. C. Anderson (2003). "Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma." *Clin Adv Hematol Oncol* **1**(10): 596-600.
- Richardson, P. G., B. Barlogie, et al. (2005). "Clinical factors predictive of outcome with bortezomib in patients with relapsed, refractory multiple myeloma." *Blood* **106**(9): 2977-2981.
- Richardson, P. G., T. Hideshima, et al. (2003). "Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers." *Cancer Control* **10**(5): 361-369.
- Richardson, P. G., T. Hideshima, et al. (2004). "Proteasome inhibition in hematologic malignancies." *Ann Med* **36**(4): 304-314.
- Richardson, P. G., C. Mitsiades, et al. (2008). "Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma." *Expert Rev Anticancer Ther* **8**(7): 1053-1072.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." *Nature* **433**(7025): 477-480.
- Rivella, S. (2009). "Ineffective erythropoiesis and thalassemias." *Curr Opin Hematol* **16**(3): 187-194.

- Robert J. (November 2007). Les poisons du fuseau. Oncologie, Volume 9, Issue 11, pp 766-772
- Rogers, G. W., Jr., N. J. Richter, et al. (2001). "Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F." J Biol Chem **276**(33): 30914-30922.
- Rogers, G. W., Jr., N. J. Richter, et al. (1999). "Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A." J Biol Chem **274**(18): 12236-12244.
- Rojo, F., L. Najera, et al. (2007). "4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis." Clin Cancer Res **13**(1): 81-89.
- Rolli-Derkinderen, M., F. Machavoine, et al. (2003). "ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1." J Biol Chem **278**(21): 18859-18867.
- Rong, L., M. Livingstone, et al. (2008). "Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs." RNA **14**(7): 1318-1327.
- Rosenwald, I. B., A. Lazaris-Karatzas, et al. (1993). "Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E." Mol Cell Biol **13**(12): 7358-7363.
- Rosner, M., C. Fuchs, et al. (2009). "Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle." Hum Mol Genet **18**(17): 3298-3310.
- Ross JS. (2009) Drug News Perspect;22(2):93-106. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2therapy.
- Rossoll, W., S. Jablonka, et al. (2003). "Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons." J Cell Biol **163**(4): 801-812.
- Rousseau, D., A. C. Gingras, et al. (1996). "The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth." Oncogene **13**(11): 2415-2420.
- Rousseau, D., R. Kaspar, et al. (1996). "Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1065-1070.
- Ruggero, D., L. Montanaro, et al. (2004). "The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis." Nat Med **10**(5): 484-486.
- Rupert Bartsch, Christoph C Zielinski (2012) Adjuvant systemic therapy for early breast cancer. HAMDAN MEDICAL JOURNAL ; Vol 5, No 1
- Rusnak, D. W., K. Lackey, et al. (2001). "The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo." Mol Cancer Ther **1**(2): 85-94.

- Rutgers, H. C., R. M. Batt, et al. (1996). "Intestinal permeability and function in dogs with small intestinal bacterial overgrowth." J Small Anim Pract **37**(9): 428-434.
- Sabatini, D. M. (2006). "mTOR and cancer: insights into a complex relationship." Nat Rev Cancer **6**(9): 729-734.
- Salerno, S., F. Da Settimo, et al. (2010). "Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs." Curr Med Chem **17**(35): 4270-4290.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." Curr Biol **14**(14): 1296-1302.
- Schieke, S. M., D. Phillips, et al. (2006). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity." J Biol Chem **281**(37): 27643-27652.
- Schmidt, E. V. (1999). "The role of c-myc in cellular growth control." Oncogene **18**(19): 2988-2996.
- Sefton, B. M. (2001). "Overview of protein phosphorylation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 14**: Unit 14 11.
- Serrano-Sanchez, (2009). Translational Research in the Development of Bortezomib: A Core Model. Published on July 26, 2009, Discovery medicine.
- Shah, S. A., M. W. Potter, et al. (2001). "Ubiquitin proteasome pathway: implications and advances in cancer therapy." Surg Oncol **10**(1-2): 43-52.
- Shah, S. A., M. W. Potter, et al. (2001). "26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer." J Cell Biochem **82**(1): 110-122.
- Shantz, L. M. and A. E. Pegg (1994). "Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation." Cancer Res **54**(9): 2313-2316.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.
- Shih, J. W., W. T. Wang, et al. (2012). "Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response." Biochem J **441**(1): 119-129.
- Silvera, D., S. C. Formenti, et al. (2010). "Translational control in cancer." Nat Rev Cancer **10**(4): 254-266.
- Sinha, B. K. (1995). "Topoisomerase inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer." Drugs **49**(1): 11-19.
- Sonenberg, N. (2008). "eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research." Biochem Cell Biol **86**(2): 178-183.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2007). "New modes of translational control in development, behavior, and disease." Mol Cell **28**(5): 721-729.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." Cell **136**(4): 731-745.
- Sonenberg, N., M. A. Morgan, et al. (1978). "A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4843-4847.
- Sonenberg, N. and A. Pause (2006). "Signal transduction. Protein synthesis and oncogenesis meet again." Science **314**(5798): 428-429.

- Sonenberg, N., K. M. Rupprecht, et al. (1979). "Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4345-4349.
- Spector N, Xia W, El-Hariry I, Yarden Y, Bacus S (2007) HER2 therapy. Small molecule HER-2 tyrosine kinase inhibitors. Breast Cancer Res. ; 9(2): 205.
- Sterz, J., I. von Metzler, et al. (2008). "The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy." Expert Opin Investig Drugs **17**(6): 879-895.
- Stohr, N., M. Lederer, et al. (2006). "ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress." J Cell Biol **175**(4): 527-534.
- Sunwoo, J. B., Z. Chen, et al. (2001). "Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **7**(5): 1419-1428.
- Svitkin, Y. V., B. Herdy, et al. (2005). "Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation." Mol Cell Biol **25**(23): 10556-10565.
- Takahara, T., K. Hara, et al. (2006). "Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region." J Biol Chem **281**(39): 28605-28614.
- Takahashi, T., K. Hara, et al. (2000). "Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro." Genes Cells **5**(9): 765-775.
- Tang, Z. Y., Y. L. Wu, et al. (2008). "Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells." J Surg Res **145**(1): 111-123.
- Thakor, N. and M. Holcik (2012). "IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2alpha- independent manner during stress." Nucleic Acids Res **40**(2): 541-552.
- Thoreen, C. C., L. Chantranupong, et al. (2012). "A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation." Nature **485**(7396): 109-113.
- Thoreen, C. C., S. A. Kang, et al. (2009). "An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1." J Biol Chem **284**(12): 8023-8032.
- Tiwari, M. (2012). "Antimetabolites: established cancer therapy." J Cancer Res Ther **8**(4): 510-519.
- Tomoda, H. and S. Omura (2000). "Lactacystin, a proteasome inhibitor: discovery and its application in cell biology." Yakugaku Zasshi **120**(10): 935-949.
- Tomoo, K., X. Shen, et al. (2003). "Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations." J Mol Biol **328**(2): 365-383.

- Topisirovic, I., M. Ruiz-Gutierrez, et al. (2004). "Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities." *Cancer Res* **64**(23): 8639-8642.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, et al. (2009). "The eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and HuR RNA operons collaboratively regulate the expression of survival and proliferative genes." *Cell Cycle* **8**(7): 960-961.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, et al. (2009). "Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP." *EMBO J* **28**(8): 1087-1098.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, et al. (2009). "Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer." *Mol Cell Biol* **29**(5): 1152-1162.
- Tourriere, H., K. Chebli, et al. (2003). "The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules." *J Cell Biol* **160**(6): 823-831.
- Uniacke, J. and W. Zerges (2008). "Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *J Cell Biol* **182**(4): 641-646.
- Valasek, L., K. H. Nielsen, et al. (2004). "Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9437-9455.
- Vanderklisch, P. W. and G. M. Edelman (2005). "Differential translation and fragile X syndrome." *Genes Brain Behav* **4**(6): 360-384.
- Vanderweyde, T., K. Youmans, et al. (2013). "Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review." *Gerontology* **59**(6): 524-533.
- Vazquez-Martin, A., C. Oliveras-Ferraros, et al. (2011). "Lapatinib, a dual HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor, augments basal cleavage of HER2 extracellular domain (ECD) to inhibit HER2-driven cancer cell growth." *J Cell Physiol* **226**(1): 52-57.
- Vazquez-Martin, A., C. Oliveras-Ferraros, et al. (2009). "mTOR inhibitors and the anti-diabetic biguanide metformin: new insights into the molecular management of breast cancer resistance to the HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb)." *Clin Transl Oncol* **11**(7): 455-459.
- Vilella-Bach, M., P. Nuzzi, et al. (1999). "The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression." *J Biol Chem* **274**(7): 4266-4272.
- Vlasova, I. A. and P. R. Bohjanen (2008). "Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins." *RNA Biol* **5**(4): 201-207.
- Vlasova, I. A., N. M. Tahoe, et al. (2008). "Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1." *Mol Cell* **29**(2): 263-270.
- Waelter, S., A. Boeddrich, et al. (2001). "Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation." *Mol Biol Cell* **12**(5): 1393-1407.

- Waelter, S., E. Scherzinger, et al. (2001). "The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis." *Hum Mol Genet* **10**(17): 1807-1817.
- Wang, L., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1." *J Biol Chem* **281**(34): 24293-24303.
- Wang, S., I. B. Rosenwald, et al. (1999). "Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas." *Am J Pathol* **155**(1): 247-255.
- Wang, X., A. Beugnet, et al. (2005). "Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins." *Mol Cell Biol* **25**(7): 2558-2572.
- Wang, X., A. Flynn, et al. (1998). "The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways." *J Biol Chem* **273**(16): 9373-9377.
- Watkins, S. J. and C. J. Norbury (2002). "Translation initiation and its deregulation during tumorigenesis." *Br J Cancer* **86**(7): 1023-1027.
- Waxman, H. S. and M. Rabinovitz (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.
- Weerapana, E. and B. Imperiali (2006). "Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems." *Glycobiology* **16**(6): 91R-101R.
- Weinberg RA., (2013) The clonal evolution of tumor cell populations. The biology of Cancer-2th edition, *Garland Science, Taylor & Francis Group.*
- Wek, R. C., H. Y. Jiang, et al. (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 1): 7-11.
- West, N. W., A. Garcia-Vargas, et al. (2013). "OSU-03012 sensitizes breast cancers to lapatinib-induced cell killing: a role for Nck1 but not Nck2." *BMC Cancer* **13**: 256.
- Whalen, S. G., A. C. Gingras, et al. (1996). "Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins." *J Biol Chem* **271**(20): 11831-11837.
- White, J. P., A. M. Cardenas, et al. (2007). "Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase." *Cell Host Microbe* **2**(5): 295-305.
- Wilhelm, S. M., C. Carter, et al. (2004). "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis." *Cancer Res* **64**(19): 7099-7109.
- Wippich, F., B. Bodenmiller, et al. (2013). "Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling." *Cell* **152**(4): 791-805.

- Wood, E. R., A. T. Truesdale, et al. (2004). "A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells." Cancer Res **64**(18): 6652-6659.
- Wu, X. N., X. K. Wang, et al. (2011). "Phosphorylation of Raptor by p38beta participates in arsenite-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation." J Biol Chem **286**(36): 31501-31511.
- Xia, W., S. Bacus, et al. (2006). "A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(20): 7795-7800.
- Xia, W., C. M. Gerard, et al. (2005). "Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic anti-ErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2-overexpressing breast cancer cells." Oncogene **24**(41): 6213-6221.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." J Clin Invest **115**(10): 2656-2664.
- Yamaguchi, S., H. Ishihara, et al. (2008). "ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress." Cell Metab **7**(3): 269-276.
- Yamamoto, A., N. Murphy, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy." J Neuropathol Exp Neurol **65**(3): 217-225.
- Yanagiya, A., E. Suyama, et al. (2012). "Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E." Mol Cell **46**(6): 847-858.
- Yerlikaya, A., S. R. Kimball, et al. (2008). "Phosphorylation of eIF2alpha in response to 26S proteasome inhibition is mediated by the haem-regulated inhibitor (HRI) kinase." Biochem J **412**(3): 579-588.
- Yip, C. K., K. Murata, et al. (2010). "Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition." Mol Cell **38**(5): 768-774.
- Zhang, H. H., A. I. Lipovsky, et al. (2006). "S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt." Mol Cell **24**(2): 185-197.
- Zhou, H. and S. Huang (2010). "The complexes of mammalian target of rapamycin." Curr Protein Pept Sci **11**(6): 409-424.
- Zhou, H., Y. Luo, et al. (2010). "Updates of mTOR inhibitors." Anticancer Agents Med Chem **10**(7): 571-581.
- Zhu, N., L. Gu, et al. (2005). "Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53." Biochem Biophys Res Commun **335**(4): 1272-1279.
- Zimmer, S. G., A. DeBenedetti, et al. (2000). "Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis." Anticancer Res **20**(3A): 1343-1351.
- Zucker, W. V. and H. M. Schulman (1968). "Stimulation of globin-chain initiation by hemin in the reticulocyte cell-free system." Proc Natl Acad Sci U S A **59**(2): 582-58

CHAPITRE 9. Annexes

Annexe 1 : Tableaux des gènes analysés par micro-array

**1 - Hela shNE non traitées versus Hela shNE traitées avec Bortezomib
Fold Change inférieur 0.5**

RefSeq	Gene	Nom du gène
NM_138720.1	HIST1H2BD	Homo sapiens histone cluster 1, H2bd (HIST1H2BD), transcript variant 2, mRNA.
NM_001032290.1	PSRC1	Homo sapiens proline/serine-rich coiled-coil 1 (PSRC1), transcript variant 4, mRNA.
NM_024775.9	GEMIN6	Homo sapiens gem (nuclear organelle) associated protein 6 (GEMIN6), mRNA.
XM_001132317.1	LOC401397	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC401397 (LOC401397), mRNA.
NM_002982.3	CCL2	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA.
NM_000318.2	PXMP3	Homo sapiens peroxisomal membrane protein 3, 35kDa (PXMP3), transcript variant 1, mRNA.
NM_003467.2	CXCR4	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 2, mRNA.
NM_018285.2	IMP3	Homo sapiens IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast) (IMP3), mRNA.
NM_032637.2	SKP2	Homo sapiens S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (SKP2), transcript variant 2, mRNA.
NM_001634.4	AMD1	Homo sapiens adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD1), transcript variant 1, mRNA.

NM_002546.3	TNFRSF11B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (TNFRSF11B), mRNA.
NM_005983.2	SKP2	Homo sapiens S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (SKP2), transcript variant 1, mRNA.
NM_138720.1	HIST1H2BD	Homo sapiens histone cluster 1, H2bd (HIST1H2BD), transcript variant 2, mRNA.
NM_001008540.1	CXCR4	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 1, mRNA.
NM_032901.2	C12orf62	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 62 (C12orf62), mRNA.
NM_002048.1	GAS1	Homo sapiens growth arrest-specific 1 (GAS1), mRNA.
NM_201253.1	CRB1	Homo sapiens crumbs homolog 1 (Drosophila) (CRB1), mRNA.
NM_014344.2	FJX1	Homo sapiens four jointed box 1 (Drosophila) (FJX1), mRNA.
NM_032936.2	TMEM60	Homo sapiens transmembrane protein 60 (TMEM60), mRNA.
XM_001726766.1	LOC100130932	PREDICTED: Homo sapiens similar to Sm protein G (LOC100130932), mRNA.
NM_205841.2	SPINK6	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 6 (SPINK6), mRNA.
XM_928075.2	LOC643287	PREDICTED: Homo sapiens similar to prothymosin alpha, transcript variant 1 (LOC643287), mRNA.
NM_003512.3	HIST1H2AC	Homo sapiens histone cluster 1, H2ac (HIST1H2AC), mRNA.
NM_152692.3	C1GALT1C1	Homo sapiens C1GALT1-specific chaperone 1 (C1GALT1C1), transcript variant 1, mRNA.
NM_004846.2	EIF4E2	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2 (EIF4E2), mRNA.
NM_021928.2	SPCS3	Homo sapiens signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae) (SPCS3), mRNA.
NM_001029.3	RPS26	Homo sapiens ribosomal protein S26 (RPS26), mRNA.
NM_002353.1	TACSTD2	Homo sapiens tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2), mRNA.
XR_017711.1	LOC205251	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC205251), miscRNA.
NR_031738.1	MIR1974	Homo sapiens microRNA 1974 (MIR1974), microRNA.
NM_001033059.	AMD1	Homo sapiens adenosylmethionine

1		decarboxylase 1 (AMD1), transcript variant 2, mRNA.
NM_020186.1	ACN9	Homo sapiens ACN9 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (ACN9), mRNA.
NM_018369.1	DEPDC1B	Homo sapiens DEP domain containing 1B (DEPDC1B), mRNA.
NM_001042426.1	CENPA	Homo sapiens centromere protein A (CENPA), transcript variant 2, mRNA.
NM_001003684.1	UCRC	Homo sapiens ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (UCRC), transcript variant 2, mRNA.
NM_021177.3	LSM2	Homo sapiens LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>) (LSM2), mRNA.
NM_020644.1	TMEM9B	Homo sapiens TMEM9 domain family, member B (TMEM9B), mRNA.
NM_023937.2	MRPL34	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L34 (MRPL34), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
NM_002488.3	NDUFA2	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa (NDUFA2), mRNA.
NM_016305.2	SS18L2	Homo sapiens synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 2 (SS18L2), mRNA.
NM_005498.3	AP1M2	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit (AP1M2), mRNA.
NM_031966.2	CCNB1	Homo sapiens cyclin B1 (CCNB1), mRNA.
NM_005192.2	CDKN3	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) (CDKN3), mRNA.
NM_001466.2	FZD2	Homo sapiens frizzled homolog 2 (<i>Drosophila</i>) (FZD2), mRNA.
XM_941627.1	LOC652233	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC652233 (LOC652233), mRNA.
NM_016468.4	C14orf112	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 112 (C14orf112), mRNA.
XM_932678.1	LOC387841	PREDICTED: Homo sapiens similar to ribosomal protein L13a, transcript

		variant 2 (LOC387841), mRNA.
XR_017589.2	LOC389156	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC389156), miscRNA.
NM_172251.1	MRPL54	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L54 (MRPL54), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
BU588364		AGENCOURT_8911223 NIH_MGC_141 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6386615 5, mRNA sequence
NM_003392.3	WNT5A	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A), mRNA.
XM_935588.1	LOC641848	PREDICTED: Homo sapiens similar to ribosomal protein S3a (LOC641848), mRNA.
XM_001715544.1	LOC10012967 3	PREDICTED: Homo sapiens similar to hCG2042915 (LOC100129673), mRNA.

**2- Hela shNE non traitées versus Hela shHRI traitées avec Bortezomib
Fold Change supérieur à 2.1**

RefSeq	Gene	Nom du gène
NM_002155.3	HSPA6	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B') (HSPA6), mRNA.
NM_005346.3	HSPA1B	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B), mRNA.
NR_024151.1	HSPA7	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 7 (HSP70B) (HSPA7), non-coding RNA.
NM_005345.4	HSPA1A	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA.
NM_002155.3	HSPA6	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B') (HSPA6), mRNA.
NM_133328.2	DEDD2	Homo sapiens death effector domain containing 2 (DEDD2), mRNA.
NM_006145.1	DNAJB1	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (DNAJB1), mRNA.
NM_004281.3	BAG3	Homo sapiens BCL2-associated athanogene 3 (BAG3), mRNA.
NM_018602.2	DNAJA4	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4 (DNAJA4), mRNA.
NM_001040619.1	ATF3	Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3), transcript variant 4, mRNA.
NM_003714.2	STC2	Homo sapiens stanniocalcin 2 (STC2), mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.
NM_018948.2	ERRFI1	Homo sapiens ERBB receptor feedback inhibitor 1 (ERRFI1), mRNA.
NM_006644.2	HSPH1	Homo sapiens heat shock 105kDa/110kDa protein 1 (HSPH1), mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.
NM_014330.2	PPP1R15A	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A (PPP1R15A), mRNA.
NR_023371.1	RN5S9	Homo sapiens RNA, 5S ribosomal 9

		(RN5S9), ribosomal RNA.
XR_038244.1	LOC652750	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC652750), partial miscRNA.
NM_133443.1	GPT2	Homo sapiens glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2 (GPT2), mRNA.
NM_004083.4	DDIT3	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3), mRNA.
NM_198057.2	TSC22D3	Homo sapiens TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3), transcript variant 1, mRNA.
NM_021158.3	TRIB3	Homo sapiens tribbles homolog 3 (Drosophila) (TRIB3), mRNA.
NM_004089.3	TSC22D3	Homo sapiens TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3), transcript variant 2, mRNA.
NM_000584.2	IL8	Homo sapiens interleukin 8 (IL8), mRNA.
NM_005080.2	XBP1	Homo sapiens X-box binding protein 1 (XBP1), transcript variant 1, mRNA.
NM_033397.2	ITPRIP	Homo sapiens inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein (ITPRIP), mRNA.
NM_182491.1	ZFAND2A	Homo sapiens zinc finger, AN1-type domain 2A (ZFAND2A), mRNA.
NM_019058.2	DDIT4	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4), mRNA.
NM_001010990.1	HERPUD1	Homo sapiens homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (HERPUD1), transcript variant 3, mRNA.
NM_001010990.1	HERPUD1	Homo sapiens homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (HERPUD1), transcript variant 3, mRNA.
NM_000389.2	CDKN1A	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA.
NM_006736.5	DNAJB2	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2 (DNAJB2), transcript variant 2, mRNA.
NM_007034.3	DNAJB4	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4), mRNA.
NM_006931.1	SLC2A3	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (SLC2A3), mRNA.
NM_033397.2	ITPRIP	Homo sapiens inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein (ITPRIP), mRNA.

NM_002228.3	JUN	Homo sapiens jun oncogene (JUN), mRNA.
NM_004864.1	GDF15	Homo sapiens growth differentiation factor 15 (GDF15), mRNA.
NM_001079539.1	XBP1	Homo sapiens X-box binding protein 1 (XBP1), transcript variant 2, mRNA.
NM_001042483.1	NUPR1	Homo sapiens nuclear protein, transcriptional regulator, 1 (NUPR1), transcript variant 1, mRNA.
NM_015675.2	GADD45B	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45B), mRNA.
NM_001235.2	SERPINH1	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) (SERPINH1), mRNA.
NM_018310.2	BRF2	Homo sapiens BRF2, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor, BRF1-like (BRF2), mRNA.
NM_013370.2	OKL38	Homo sapiens pregnancy-induced growth inhibitor (OKL38), transcript variant 1, mRNA.
NM_020127.1	TUFT1	Homo sapiens tuftelin 1 (TUFT1), mRNA.
NM_000963.1	PTGS2	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2), mRNA.
NM_153742.3	CTH	Homo sapiens cystathionase (cystathionine gamma-lyase) (CTH), transcript variant 2, mRNA.
XR_038616.1	LOC344887	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC344887), miscRNA.
NM_003565.1	ULK1	Homo sapiens unc-51-like kinase 1 (C. elegans) (ULK1), mRNA.
NM_031412.2	GABARAPL1	Homo sapiens GABA(A) receptor-associated protein like 1 (GABARAPL1), mRNA.
NM_005088.2	SFRS17A	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 17A (SFRS17A), transcript variant 1, mRNA.
NM_012124.1	CHORDC1	Homo sapiens cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1 (CHORDC1), mRNA.
NM_017617.3	NOTCH1	Homo sapiens Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1), mRNA.

NM_016270.2	KLF2	Homo sapiens Kruppel-like factor 2 (lung) (KLF2), mRNA.
NM_021009.3	UBC	Homo sapiens ubiquitin C (UBC), mRNA.
NM_001008239.2	C18ORF25	Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 25 (C18orf25), transcript variant 2, mRNA.
NM_002133.1	HMOX1	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA.
NM_018357.2	LARP6	Homo sapiens La ribonucleoprotein domain family, member 6 (LARP6), transcript variant 1, mRNA.
NM_006985.1	NPIP	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein (NPIP), mRNA.
NM_001806.2	CEBPG	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma (CEBPG), mRNA.
NM_003842.3	TNFRSF10B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B), transcript variant 1, mRNA.
NM_003565.1	ULK1	Homo sapiens unc-51-like kinase 1 (C. elegans) (ULK1), mRNA.
NR_003249.1	HNRPDL	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL), transcript variant 3, transcribed RNA.
AK096179	HS.25892	Homo sapiens cDNA FLJ38860 fis, clone MESAN2011977
NM_021127.1	PMAIP1	Homo sapiens phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1), mRNA.
NM_015330.1	CYTSA	Homo sapiens cytospin A (CYTSA), mRNA.
NM_014840.2	NUAK1	Homo sapiens NUAK family, SNF1-like kinase, 1 (NUAK1), mRNA.
NM_012111.1	AHSA1	Homo sapiens AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast) (AHSA1), mRNA.
NM_033103.3	RHPN2	Homo sapiens rhophilin, Rho GTPase binding protein 2 (RHPN2), mRNA.
NM_014365.2	HSPB8	Homo sapiens heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8), mRNA.

**3- Hela shHRI non traitées versus Hela shHRI traitées avec Bortezomib
Fold Change inférieur 0.5**

RefSeq	Gene	Nom du gène
NM_032862.2	TIGD5	Homo sapiens tigger transposable element derived 5 (TIGD5), mRNA.
NM_018285.2	IMP3	Homo sapiens IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast) (IMP3), mRNA.
NM_024091.2	FASTKD3	Homo sapiens FAST kinase domains 3 (FASTKD3), mRNA.
NM_002129.2	HMGB2	Homo sapiens high-mobility group box 2 (HMGB2), mRNA.
NM_001761.1	CCNF	Homo sapiens cyclin F (CCNF), mRNA.
NM_032290.2	ANKRD32	Homo sapiens ankyrin repeat domain 32 (ANKRD32), mRNA.
NM_012177.2	FBX05	Homo sapiens F-box protein 5 (FBX05), mRNA.
NM_001206.2	KLF9	Homo sapiens Kruppel-like factor 9 (KLF9), mRNA.
NM_014344.2	FJX1	Homo sapiens four jointed box 1 (Drosophila) (FJX1), mRNA.
NR_015434.1	LOC148413	Homo sapiens hypothetical LOC148413 (LOC148413), non-coding RNA.
NM_001032290.1	PSRC1	Homo sapiens proline/serine-rich coiled-coil 1 (PSRC1), transcript variant 4, mRNA.
NM_001423.1	EMP1	Homo sapiens epithelial membrane protein 1 (EMP1), mRNA.
NM_031942.4	CDCA7	Homo sapiens cell division cycle associated 7 (CDCA7), transcript variant 1, mRNA.
NM_013332.3	C7ORF68	Homo sapiens chromosome 7 open reading frame 68 (C7orf68), transcript variant 1, mRNA.
NM_002048.1	GAS1	Homo sapiens growth arrest-specific 1 (GAS1), mRNA.
NM_003392.3	WNT5A	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A), mRNA.
NM_006516.1	SLC2A1	Homo sapiens solute carrier family 2

		(facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1), mRNA.
NM_032936.2	TMEM60	Homo sapiens transmembrane protein 60 (TMEM60), mRNA.
NM_024091.2	FASTKD3	Homo sapiens FAST kinase domains 3 (FASTKD3), mRNA.
NM_152833.2	C9ORF69	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 69 (C9orf69), mRNA.
NM_015683.1	ARRDC2	Homo sapiens arrestin domain containing 2 (ARRDC2), transcript variant 1, mRNA.
NM_178539.3	FAM19A2	Homo sapiens family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A2 (FAM19A2), mRNA.
NR_002987.1	SNORA61	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 61 (SNORA61), small nucleolar RNA.
NM_004206.2	SEC22C	Homo sapiens SEC22 vesicle trafficking protein homolog C (S. cerevisiae) (SEC22C), transcript variant 2, mRNA.
XM_931434.2	LOC400027	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical gene supported by BC047417, transcript variant 2 (LOC400027), mRNA.
NM_004091.2	E2F2	Homo sapiens E2F transcription factor 2 (E2F2), mRNA.
NM_005318.2	H1F0	Homo sapiens H1 histone family, member 0 (H1F0), mRNA.
NR_004380.1	SNORD104	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 104 (SNORD104), small nucleolar RNA.
NM_053045.1	TMEM203	Homo sapiens transmembrane protein 203 (TMEM203), mRNA.
NM_006963.3	ZNF22	Homo sapiens zinc finger protein 22 (KOX 15) (ZNF22), mRNA.
NM_005983.2	SKP2	Homo sapiens S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (SKP2), transcript variant 1, mRNA.
NM_182796.1	MAT2B	Homo sapiens methionine adenosyltransferase II, beta (MAT2B), transcript variant 2, mRNA.
NM_002129.2	HMGB2	Homo sapiens high-mobility group box 2 (HMGB2), mRNA.
NM_057735.1	CCNE2	Homo sapiens cyclin E2 (CCNE2), transcript variant 2, mRNA.

**4- Hela shHRI non traitées versus Hela shHRI traitées avec Bortezomib
Fold Change supérieur à 2.1**

RefSeq	Gene	Nom du gène
NM_002155.3	HSPA6	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B') (HSPA6), mRNA.
NR_024151.1	HSPA7	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 7 (HSP70B) (HSPA7), non-coding RNA.
NM_002155.3	HSPA6	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B') (HSPA6), mRNA.
XR_038244.1	LOC652750	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC652750), partial miscRNA.
NM_006145.1	DNAJB1	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (DNAJB1), mRNA.
NM_005346.3	HSPA1B	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B), mRNA.
NM_018602.2	DNAJA4	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4 (DNAJA4), mRNA.
NM_005345.4	HSPA1A	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA.
NR_023371.1	RN5S9	Homo sapiens RNA, 5S ribosomal 9 (RN5S9), ribosomal RNA.
NM_004281.3	BAG3	Homo sapiens BCL2-associated athanogene 3 (BAG3), mRNA.
NM_133328.2	DEDD2	Homo sapiens death effector domain containing 2 (DEDD2), mRNA.
NM_001235.2	SERPINH1	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) (SERPINH1), mRNA.
NM_182491.1	ZFAND2A	Homo sapiens zinc finger, AN1-type domain 2A (ZFAND2A), mRNA.
NM_004864.1	GDF15	Homo sapiens growth differentiation factor 15 (GDF15), mRNA.
NM_006644.2	HSPH1	Homo sapiens heat shock 105kDa/110kDa protein 1 (HSPH1), mRNA.
NM_000584.2	IL8	Homo sapiens interleukin 8 (IL8), mRNA.
NM_00104061 9.1	ATF3	Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3), transcript variant 4,

NR_024392.1	HSPBL2	mRNA. Homo sapiens heat shock 27kDa protein-like 2 pseudogene (HSPBL2), non-coding RNA.
NM_004083.4	DDIT3	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3), mRNA.
NM_002923.1	RGS2	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 2, 24kDa (RGS2), mRNA.
NM_003714.2	STC2	Homo sapiens stanniocalcin 2 (STC2), mRNA.
NM_018310.2	BRF2	Homo sapiens BRF2, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor, BRF1-like (BRF2), mRNA.
NM_014330.2	PPP1R15A	Homo sapiens phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A (PPP1R15A), mRNA.
NM_002448.3	MSX1	Homo sapiens msh homeobox 1 (MSX1), mRNA.
NM_00101099 0.1	HERPUD1	Homo sapiens homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (HERPUD1), transcript variant 3, mRNA.
NM_006931.1	SLC2A3	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (SLC2A3), mRNA.
NM_021009.3	UBC	Homo sapiens ubiquitin C (UBC), mRNA.
NM_002133.1	HMOX1	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA.
NR_023344.1	RNU6ATAC	Homo sapiens RNA, U6atac small nuclear (U12-dependent splicing) (RNU6ATAC), small nuclear RNA.
NM_014278.2	HSPA4L	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 4-like (HSPA4L), mRNA.
NM_00103174 4.1	LOC158160	Homo sapiens hypothetical protein LOC158160 (LOC158160), transcript variant 1, mRNA.
NM_018948.2	ERRFI1	Homo sapiens ERBB receptor feedback inhibitor 1 (ERRFI1), mRNA.
NM_005347.2	HSPA5	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (HSPA5), mRNA.
NM_016545.4	IER5	Homo sapiens immediate early response 5 (IER5), mRNA.
NM_000389.2	CDKN1A	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.

NM_000584.2	IL8	Homo sapiens interleukin 8 (IL8), mRNA.
NM_00101099 0.1	HERPUD1	Homo sapiens homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (HERPUD1), transcript variant 3, mRNA.
NM_004089.3	TSC22D3	Homo sapiens TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3), transcript variant 2, mRNA.
NM_001885.1	CRYAB	Homo sapiens crystallin, alpha B (CRYAB), mRNA.
NM_012342.2	BAMBI	Homo sapiens BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis) (BAMBI), mRNA.
NM_007034.3	DNAJB4	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4), mRNA.
NM_012124.1	CHORDC1	Homo sapiens cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1 (CHORDC1), mRNA.
NM_007034.3	DNAJB4	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4), mRNA.
NM_000067.1	CA2	Homo sapiens carbonic anhydrase II (CA2), mRNA.
NR_003287.1	LOC100008589	Homo sapiens 28S ribosomal RNA (LOC100008589), non-coding RNA.
NM_021127.1	PMAIP1	Homo sapiens phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1), mRNA.
NM_00101796 3.2	HSP90AA1	Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1), transcript variant 1, mRNA.
U62823		Human small nuclear RNA U6atac, partial sequence
NM_012111.1	AHSA1	Homo sapiens AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast) (AHSA1), mRNA.
XM_00171380 8.1	LOC100132564	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100132564 (LOC100132564), mRNA.
NM_173510.1	CCDC117	Homo sapiens coiled-coil domain containing 117 (CCDC117), mRNA.
NM_198057.2	TSC22D3	Homo sapiens TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3), transcript variant 1, mRNA.

NM_014365.2	HSPB8	Homo sapiens heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8), mRNA.
NM_006594.1	AP4B1	Homo sapiens adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit (AP4B1), mRNA.
NM_00102464 6.1	CLK1	Homo sapiens CDC-like kinase 1 (CLK1), transcript variant 2, mRNA.
NM_000527.2	LDLR	Homo sapiens low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) (LDLR), mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.
NM_000067.1	CA2	Homo sapiens carbonic anhydrase II (CA2), mRNA.
NM_00101797 3.1	P4HA2	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2), transcript variant 2, mRNA.
NM_013370.2	OKL38	Homo sapiens pregnancy-induced growth inhibitor (OKL38), transcript variant 1, mRNA.
NM_002970.1	SAT1	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1), mRNA.
NM_032487.3	ARPM1	Homo sapiens actin related protein M1 (ARPM1), mRNA.
NM_012242.2	DKK1	Homo sapiens dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis) (DKK1), mRNA.
NM_005931.2	MICB	Homo sapiens MHC class I polypeptide-related sequence B (MICB), mRNA.
XM_929153.1	LOC646197	PREDICTED: Homo sapiens similar to Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (Tumor-specific transplantation 84 kDa antigen) (TSTA) (LOC646197), mRNA.
NM_001124.1	ADM	Homo sapiens adrenomedullin (ADM), mRNA.
NM_00101797 4.1	P4HA2	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2), transcript variant 3, mRNA.
NM_031412.2	GABARAPL1	Homo sapiens GABA(A) receptor-associated protein like 1 (GABARAPL1), mRNA.
NM_139314.1	ANGPTL4	Homo sapiens angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), transcript variant 1, mRNA.
NM_000602.1	SERPINE1	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.
NM_014161.2	MRPL18	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L18 (MRPL18), nuclear gene

		encoding mitochondrial protein, mRNA.
NM_004071.2	CLK1	Homo sapiens CDC-like kinase 1 (CLK1), mRNA.
NM_001945.1	HBEGF	Homo sapiens heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF), mRNA.
NM_181726.2	ANKRD37	Homo sapiens ankyrin repeat domain 37 (ANKRD37), mRNA.
NM_004417.2	DUSP1	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), mRNA.
NM_004577.3	PSPH	Homo sapiens phosphoserine phosphatase (PSPH), mRNA.
NM_014391.2	ANKRD1	Homo sapiens ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) (ANKRD1), mRNA.
XR_038951.1	LOC644877	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC644877), miscRNA.
NM_020119.3	ZC3HAV1	Homo sapiens zinc finger CCCH-type, antiviral 1 (ZC3HAV1), transcript variant 1, mRNA.
NM_144717.2	IL20RB	Homo sapiens interleukin 20 receptor beta (IL20RB), mRNA.
NM_198336.1	INSIG1	Homo sapiens insulin induced gene 1 (INSIG1), transcript variant 2, mRNA.
NM_001547.4	IFIT2	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2), mRNA.
NM_005080.2	XBP1	Homo sapiens X-box binding protein 1 (XBP1), transcript variant 1, mRNA.
NM_016084.3	RASD1	Homo sapiens RAS, dexamethasone-induced 1 (RASD1), mRNA.
NR_003051.2	RMRP	Homo sapiens RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP), RNase MRP RNA.
XM_00171380 9.1	LOC1001323 94	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100132394 (LOC100132394), mRNA.
NM_004071.2	CLK1	Homo sapiens CDC-like kinase 1 (CLK1), mRNA.
NM_145306.2	C10orf35	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 35 (C10orf35), mRNA.
NM_017617.3	NOTCH1	Homo sapiens Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1), mRNA.

NR_003287.1	LOC100008589	Homo sapiens 28S ribosomal RNA (LOC100008589), non-coding RNA.
NM_014412.2	CACYBP	Homo sapiens calcyclin binding protein (CACYBP), transcript variant 1, mRNA.
NM_004567.2	PFKFB4	Homo sapiens 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 (PFKFB4), mRNA.
NM_007355.2	HSP90AB1	Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (HSP90AB1), mRNA.
NM_004577.3	PSPH	Homo sapiens phosphoserine phosphatase (PSPH), mRNA.
NM_052971.2	LEAP2	Homo sapiens liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2), mRNA.
NR_015449.1	RNF216L	Homo sapiens ring finger protein 216-like (RNF216L), transcript variant 2, non-coding RNA.
XM_934529.1	HSPCAL3	PREDICTED: Homo sapiens heat shock 90kDa protein 1, alpha-like 3, transcript variant 3 (HSPCAL3), mRNA.
NM_182810.1	ATF4	Homo sapiens activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4), transcript variant 2, mRNA.
NM_005980.2	S100P	Homo sapiens S100 calcium binding protein P (S100P), mRNA.
NM_000963.1	PTGS2	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2), mRNA.
NM_005494.2	DNAJB6	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6 (DNAJB6), transcript variant 2, mRNA.
NM_014161.2	MRPL18	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L18 (MRPL18), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
NM_002154.3	HSPA4	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 4 (HSPA4), mRNA.
NM_024298.2	MBOAT7	Homo sapiens membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 (MBOAT7), mRNA.
NM_182980.2	OSGIN1	Homo sapiens oxidative stress induced growth inhibitor 1 (OSGIN1), transcript variant 2, mRNA.
XR_017355.2	LOC644877	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC644877), miscRNA.
NM_153742.3	CTH	Homo sapiens cystathionase (cystathionine gamma-lyase) (CTH), transcript variant 2, mRNA.

NM_002130.6	HMGCS1	Homo sapiens 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble) (HMGCS1), transcript variant 2, mRNA.
NM_138340.3	ABHD3	Homo sapiens abhydrolase domain containing 3 (ABHD3), mRNA.
NM_005348.2	HSP90AA1	Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1), transcript variant 2, mRNA.
NM_017544.2	NKRF	Homo sapiens NFkB repressing factor (NKRF), mRNA.
NM_003842.3	TNFRSF10B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B), transcript variant 1, mRNA.
NR_004408.1	RNU1-3	Homo sapiens RNA, U1 small nuclear 3 (RNU1-3), small nuclear RNA.
NR_004426.1	RNU1G2	Homo sapiens RNA, U1G2 small nuclear (RNU1G2), small nuclear RNA.
XR_019393.1	LOC387820	PREDICTED: Homo sapiens similar to DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6 isoform a (LOC387820), mRNA.
NM_002014.2	FKBP4	Homo sapiens FK506 binding protein 4, 59kDa (FKBP4), mRNA.
NM_003449.3	TRIM26	Homo sapiens tripartite motif-containing 26 (TRIM26), mRNA.
NM_020127.1	TUFT1	Homo sapiens tuftelin 1 (TUFT1), mRNA.
NM_00107953 9.1	XBP1	Homo sapiens X-box binding protein 1 (XBP1), transcript variant 2, mRNA.
NM_032323.1	TMEM79	Homo sapiens transmembrane protein 79 (TMEM79), mRNA.
NM_00100134 2.1	BLOC1S2	Homo sapiens biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 2 (BLOC1S2), transcript variant 2, mRNA.
NM_001570.3	IRAK2	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2), mRNA.
NM_003840.3	TNFRSF10D	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain (TNFRSF10D), mRNA.
NM_005063.4	SCD	Homo sapiens stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD), mRNA.
NM_005527.3	HSPA1L	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1-like (HSPA1L), mRNA.

XM_928353.1	LOC653602	PREDICTED: Homo sapiens similar to family with sequence similarity 84, member A (LOC653602), mRNA.
NM_013390.1	TMEM2	Homo sapiens transmembrane protein 2 (TMEM2), mRNA.
NM_006819.1	STIP1	Homo sapiens stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) (STIP1), mRNA.
NM_005461.3	MAFB	Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian) (MAFB), mRNA.
NM_003811.2	TNFSF9	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9 (TNFSF9), mRNA.
NM_133443.1	GPT2	Homo sapiens glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2 (GPT2), mRNA.
NM_033229.2	TRIM15	Homo sapiens tripartite motif-containing 15 (TRIM15), mRNA.
NM_002632.4	PGF	Homo sapiens placental growth factor (PGF), mRNA.
NM_012479.2	YWHAG	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide (YWHAG), mRNA.
NM_00100823 9.2	C18orf25	Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 25 (C18orf25), transcript variant 2, mRNA.
NM_194285.2	SPTY2D1	Homo sapiens SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (S. cerevisiae) (SPTY2D1), mRNA.
NM_007266.2	GPN1	Homo sapiens GPN-loop GTPase 1 (GPN1), mRNA.
NM_000710.2	BDKRB1	Homo sapiens bradykinin receptor B1 (BDKRB1), mRNA.
NM_197966.1	BID	Homo sapiens BH3 interacting domain death agonist (BID), transcript variant 1, mRNA.

5- Hela shNE traitées avec Bortezomib (gènes surexprimés avec Fold Change supérieur à 2.1) versus Hela shHRI traitées avec Bortezomib (Fold Change inférieur à 0.5)

NM_000478.3	ALPL	Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL), transcript variant 1, mRNA.
NM_001613.1	ACTA2	Homo sapiens actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2), mRNA.
NM_004598.3	SPOCK1	Homo sapiens sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 (SPOCK1), mRNA.
NM_001615.3	ACTG2	Homo sapiens actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACTG2), mRNA.
NM_001711.3	BGN	Homo sapiens biglycan (BGN), mRNA.
NM_016270.2	KLF2	Homo sapiens Kruppel-like factor 2 (lung) (KLF2), mRNA.
NM_001300.4	KLF6	Homo sapiens Kruppel-like factor 6 (KLF6), transcript variant 2, mRNA.
NM_173576.1	MKX	Homo sapiens mohawk homeobox (MKX), mRNA.
NM_014413.2	EIF2AK1	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1 (EIF2AK1), mRNA.
NM_005504.4	BCAT1	Homo sapiens branched chain aminotransferase 1, cytosolic (BCAT1), mRNA.
NM_152550.2	SH3RF2	Homo sapiens SH3 domain containing ring finger 2 (SH3RF2), mRNA.
NM_001008490.1	KLF6	Homo sapiens Kruppel-like factor 6 (KLF6), transcript variant 1, mRNA.
NM_003186.3	TAGLN	Homo sapiens transgelin (TAGLN), transcript variant 2, mRNA.
XM_937367.1	IL7R	PREDICTED: Homo sapiens interleukin 7 receptor (IL7R), mRNA.
NM_003186.3	TAGLN	Homo sapiens transgelin (TAGLN), transcript variant 2, mRNA.
NM_002205.2	ITGA5	Homo sapiens integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide) (ITGA5), mRNA.
NM_003246.2	THBS1	Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1), mRNA.

NM_144569.4	SPOCD1	Homo sapiens SPOC domain containing 1 (SPOCD1), mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.
NM_006288.2	THY1	Homo sapiens Thy-1 cell surface antigen (THY1), mRNA.
NM_001554.3	CYR61	Homo sapiens cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61), mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.
NM_015150.1	RFTN1	Homo sapiens raftlin, lipid raft linker 1 (RFTN1), mRNA.
NM_016352.2	CPA4	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.
NM_002006.3	FGF2	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA.
NM_006097.3	MYL9	Homo sapiens myosin, light chain 9, regulatory (MYL9), transcript variant 1, mRNA.
NM_001044391.1	MUC1	Homo sapiens mucin 1, cell surface associated (MUC1), transcript variant 6, mRNA.
NM_015927.3	TGFB1I1	Homo sapiens transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (TGFB1I1), transcript variant 2, mRNA.
NM_001042483.1	NUPR1	Homo sapiens nuclear protein, transcriptional regulator, 1 (NUPR1), transcript variant 1, mRNA.
XR_015580.2	LOC728672	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC728672), miscRNA.
NM_001753.3	CAV1	Homo sapiens caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1), mRNA.
NM_006097.3	MYL9	Homo sapiens myosin, light chain 9, regulatory (MYL9), transcript variant 1, mRNA.
NM_003567.2	BCAR3	Homo sapiens breast cancer anti-estrogen resistance 3 (BCAR3), mRNA.
NM_021101.3	CLDN1	Homo sapiens claudin 1 (CLDN1), mRNA.
NM_001955.2	EDN1	Homo sapiens endothelin 1 (EDN1), mRNA.
NM_015675.2	GADD45B	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45B), mRNA.
NM_033397.2	ITPRIP	Homo sapiens inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein (ITPRIP), mRNA.
NM_003131.2	SRF	Homo sapiens serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor) (SRF), mRNA.
NM_003714.2	STC2	Homo sapiens stanniocalcin 2 (STC2), mRNA.

NM_004619.3	TRAF5	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 5 (TRAF5), transcript variant 1, mRNA.
NM_005964.1	MYH10	Homo sapiens myosin, heavy chain 10, non-muscle (MYH10), mRNA.
NM_000358.1	TGFBI	Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFBI), mRNA.
XR_019109.1	LOC650517	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC650517 (LOC650517), mRNA.
NM_014878.4	KIAA0020	Homo sapiens KIAA0020 (KIAA0020), mRNA.
NM_002593.2	PCOLCE	Homo sapiens procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE), mRNA.
NM_016357.3	LIMA1	Homo sapiens LIM domain and actin binding 1 (LIMA1), mRNA.
NM_001993.2	F3	Homo sapiens coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) (F3), mRNA.
NM_144573.3	NEXN	Homo sapiens nexilin (F actin binding protein) (NEXN), mRNA.
NM_033397.2	ITPRIP	Homo sapiens inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein (ITPRIP), mRNA.
NM_001102.2	ACTN1	Homo sapiens actinin, alpha 1 (ACTN1), mRNA.
NM_001901.1	CTGF	Homo sapiens connective tissue growth factor (CTGF), mRNA.
NM_005159.4	ACTC1	Homo sapiens actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA.
NM_001901.2	CTGF	Homo sapiens connective tissue growth factor (CTGF), mRNA.
NM_000598.4	IGFBP3	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA.
NM_005168.3	RND3	Homo sapiens Rho family GTPase 3 (RND3), mRNA.
NM_005557.2	KRT16	Homo sapiens keratin 16 (focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma) (KRT16), mRNA.
NM_002185.2	IL7R	Homo sapiens interleukin 7 receptor (IL7R), mRNA.
NM_003045.3	SLC7A1	Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ+ system), member 1 (SLC7A1), mRNA.

NM_018192.2	LEPREL1	Homo sapiens leprecan-like 1 (LEPREL1), mRNA.
NM_001259.5	CDK6	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA.
NM_003999.1	OSMR	Homo sapiens oncostatin M receptor (OSMR), mRNA.
NM_012137.2	DDAH1	Homo sapiens dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1), mRNA.
NR_003249.1	HNRPDL	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL), transcript variant 3, transcribed RNA.
NM_014755.1	SERTAD2	Homo sapiens SERTA domain containing 2 (SERTAD2), mRNA.
NM_016205.1	PDGFC	Homo sapiens platelet derived growth factor C (PDGFC), mRNA.
NM_213674.1	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2 (beta) (TPM2), transcript variant 2, mRNA.
NM_002290.2	LAMA4	Homo sapiens laminin, alpha 4 (LAMA4), mRNA.
NM_153267.3	MAMDC2	Homo sapiens MAM domain containing 2 (MAMDC2), mRNA.
NM_001453.1	FOXC1	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA.
NM_003020.1	SCG5	Homo sapiens secretogranin V (7B2 protein) (SCG5), mRNA.
NM_201557.2	FHL2	Homo sapiens four and a half LIM domains 2 (FHL2), transcript variant 4, mRNA.
NM_201559.2	FOXO3	Homo sapiens forkhead box O3 (FOXO3), transcript variant 2, mRNA.
NM_006988.3	ADAMTS1	Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 (ADAMTS1), mRNA.
NM_201555.1	FHL2	Homo sapiens four and a half LIM domains 2 (FHL2), transcript variant 2, mRNA.
NM_001006932.1	RPS6KA2	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2 (RPS6KA2), transcript variant 2, mRNA.
NM_001135811.1	FAM60A	Homo sapiens family with sequence similarity 60, member A (FAM60A), transcript variant 1, mRNA.
NM_014840.2	NUAK1	Homo sapiens NUAKE family, SNF1-like kinase, 1 (NUAK1), mRNA.
NM_012385.1	P8	Homo sapiens p8 protein (candidate of metastasis 1) (P8), mRNA.
NM_003379.3	VIL2	Homo sapiens villin 2 (ezrin) (VIL2), mRNA.
NM_018064.2	AKIRIN2	Homo sapiens akirin 2 (AKIRIN2), mRNA.
NM_014840.2	NUAK1	Homo sapiens NUAKE family, SNF1-like kinase, 1 (NUAK1), mRNA.

NM_033157.2	CALD1	Homo sapiens caldesmon 1 (CALD1), transcript variant 3, mRNA.
XR_018848.1	LOC650369	PREDICTED: Homo sapiens similar to family with sequence similarity 60, member A (LOC650369), mRNA.
XR_015626.2	KRT17P3	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (KRT17P3), miscRNA.
NM_033140.2	CALD1	Homo sapiens caldesmon 1 (CALD1), transcript variant 5, mRNA.
NM_001845.4	COL4A1	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 1 (COL4A1), mRNA.
NM_003461.4	ZYX	Homo sapiens zyxin (ZYX), transcript variant 1, mRNA.
NM_002006.4	FGF2	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA.
NM_001002019.1	PUS1	Homo sapiens pseudouridylate synthase 1 (PUS1), transcript variant 2, mRNA.
NM_002840.3	PTPRF	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1, mRNA.
NM_015444.2	TMEM158	Homo sapiens transmembrane protein 158 (TMEM158), mRNA.
NR_003098.1	SNHG1	Homo sapiens small nucleolar RNA host gene 1 (non-protein coding) (SNHG1), non-coding RNA.
NM_021197.2	WFDC1	Homo sapiens WAP four-disulfide core domain 1 (WFDC1), mRNA.
NM_006216.2	SERPINE2	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 (SERPINE2), mRNA.
NM_001020820.1	MYADM	Homo sapiens myeloid-associated differentiation marker (MYADM), transcript variant 4, mRNA.
NM_032199.1	ARID5B	Homo sapiens AT rich interactive domain 5B (MRF1-like) (ARID5B), mRNA.
NM_003379.4	EZR	Homo sapiens ezrin (EZR), transcript variant 1, mRNA.
NM_213674.1	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2 (beta) (TPM2), transcript variant 2, mRNA.
NM_004723.2	ARHGEF2	Homo sapiens rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2 (ARHGEF2), mRNA.
NM_147134.1	NFX1	Homo sapiens nuclear transcription factor,

		X-box binding 1 (NFX1), transcript variant 3, mRNA.
NM_001013398.1	IGFBP3	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 1, mRNA.
NM_001018004.1	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), transcript variant 3, mRNA.
NM_015225.1	KIAA0367	Homo sapiens KIAA0367 (KIAA0367), mRNA.
NM_144586.5	LYPD1	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 1, mRNA.
NM_152330.2	FRMD6	Homo sapiens FERM domain containing 6 (FRMD6), mRNA.
NM_015153.1	PHF3	Homo sapiens PHD finger protein 3 (PHF3), mRNA.
NM_007085.3	FSTL1	Homo sapiens follistatin-like 1 (FSTL1), mRNA.
NM_004468.3	FHL3	Homo sapiens four and a half LIM domains 3 (FHL3), mRNA.
NM_207304.1	MBNL2	Homo sapiens muscleblind-like 2 (Drosophila) (MBNL2), transcript variant 3, mRNA.
BC043003		Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5297467
NM_017953.2	ZNHIT6	Homo sapiens zinc finger, HIT type 6 (ZNHIT6), mRNA.
NM_178275.4	IGFN1	Homo sapiens immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1 (IGFN1), mRNA.
NM_199169.1	PMEPA1	Homo sapiens prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1), transcript variant 2, mRNA.
NM_002451.3	MTAP	Homo sapiens methylthioadenosine phosphorylase (MTAP), mRNA.
NM_152522.3	ARL6IP6	Homo sapiens ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 6 (ARL6IP6), mRNA.
NM_032800.1	C1orf198	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 198 (C1orf198), mRNA.
NM_002467.3	MYC	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC), mRNA.
NM_004670.3	PAPSS2	Homo sapiens 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 (PAPSS2), transcript variant 1, mRNA.
NM_000104.2	CYP1B1	Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA.
NM_024835.2	GGNBP2	Homo sapiens gametogenetin binding protein 2 (GGNBP2), mRNA.
NM_001031716.1	OBFC2A	Homo sapiens oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold

		containing 2A (OBFC2A), mRNA.
NM_021913.2	AXL	Homo sapiens AXL receptor tyrosine kinase (AXL), transcript variant 1, mRNA.
NM_002506.2	NGF	Homo sapiens nerve growth factor (beta polypeptide) (NGF), mRNA.
NM_000422.1	KRT17	Homo sapiens keratin 17 (KRT17), mRNA.
NM_178167.2	ZNF598	Homo sapiens zinc finger protein 598 (ZNF598), mRNA.
NM_001159.3	AOX1	Homo sapiens aldehyde oxidase 1 (AOX1), mRNA.
NM_006289.2	TLN1	Homo sapiens talin 1 (TLN1), mRNA.
NM_021158.3	TRIB3	Homo sapiens tribbles homolog 3 (Drosophila) (TRIB3), mRNA.
NM_020127.1	TUFT1	Homo sapiens tuftelin 1 (TUFT1), mRNA.
NM_000600.1	IL6	Homo sapiens interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6), mRNA.
NM_023012.4	RSRC2	Homo sapiens arginine/serine-rich coiled-coil 2 (RSRC2), transcript variant 1, mRNA.
NM_001753.3	CAV1	Homo sapiens caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1), mRNA.
NM_032181.1	TMEM166	Homo sapiens transmembrane protein 166 (TMEM166), mRNA.
NM_002473.3	MYH9	Homo sapiens myosin, heavy chain 9, non-muscle (MYH9), mRNA.
NM_002084.3	GPX3	Homo sapiens glutathione peroxidase 3 (plasma) (GPX3), mRNA.
NM_002228.3	JUN	Homo sapiens jun oncogene (JUN), mRNA.
NM_001018020.1	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), transcript variant 7, mRNA.
NM_006372.3	SYNCRIP	Homo sapiens synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (SYNCRIP), mRNA.
NM_004856.4	KIF23	Homo sapiens kinesin family member 23 (KIF23), transcript variant 2, mRNA.
NM_001802.1	CDR2	Homo sapiens cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa (CDR2), mRNA.
NM_013352.2	DSE	Homo sapiens dermatan sulfate epimerase (DSE), transcript variant 1, mRNA.
NM_000465.1	BARD1	Homo sapiens BRCA1 associated RING domain 1 (BARD1), mRNA.
NM_002775.3	HTRA1	Homo sapiens HtrA serine peptidase 1 (HTRA1), mRNA.

NM_020830.3	WDFY1	Homo sapiens WD repeat and FYVE domain containing 1 (WDFY1), mRNA.
NM_002290.2	LAMA4	Homo sapiens laminin, alpha 4 (LAMA4), mRNA.
NM_012118.2	CCRN4L	Homo sapiens CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae) (CCRN4L), mRNA.

**6- Hela shNE non traitées versus Hela shHRI non traitées
Fold Change inférieur à 0.5**

RefSeq	Gene	Nom du gène
NM_000478.3	ALPL	Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL), transcript variant 1, mRNA.
NM_004598.3	SPOCK1	Homo sapiens sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 (SPOCK1), mRNA.
NM_016352.2	CPA4	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.
NM_003186.3	TAGLN	Homo sapiens transgelin (TAGLN), transcript variant 2, mRNA.
NM_006097.3	MYL9	Homo sapiens myosin, light chain 9, regulatory (MYL9), transcript variant 1, mRNA.
NM_144586.5	LYPD1	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 1, mRNA.
NM_001901.1	CTGF	Homo sapiens connective tissue growth factor (CTGF), mRNA.
NM_006288.2	THY1	Homo sapiens Thy-1 cell surface antigen (THY1), mRNA.
NM_006097.3	MYL9	Homo sapiens myosin, light chain 9, regulatory (MYL9), transcript variant 1, mRNA.
NM_001554.3	CYR61	Homo sapiens cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61), mRNA.
NM_002185.2	IL7R	Homo sapiens interleukin 7 receptor (IL7R), mRNA.
NM_001993.2	F3	Homo sapiens coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) (F3), mRNA.
NR_024337.1	C1orf133	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 133 (C1orf133), non-coding RNA. XM_001720763
NM_021101.3	CLDN1	Homo sapiens claudin 1 (CLDN1), mRNA.
NM_130851.1	BMP4	Homo sapiens bone morphogenetic protein 4 (BMP4), transcript variant 3, mRNA.

NM_000598.4	IGFBP3	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA.
NM_00104439 1.1	MUC1	Homo sapiens mucin 1, cell surface associated (MUC1), transcript variant 6, mRNA.
NM_032471.4	PKIB	Homo sapiens protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (PKIB), transcript variant 3, mRNA.
NM_000602.1	SERPINE1	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.
NM_016270.2	KLF2	Homo sapiens Kruppel-like factor 2 (lung) (KLF2), mRNA.
NM_020066.3	FMN2	Homo sapiens formin 2 (FMN2), mRNA.
NM_001753.3	CAV1	Homo sapiens caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1), mRNA.
NM_005557.2	KRT16	Homo sapiens keratin 16 (focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma) (KRT16), mRNA.
XM_00171805 0.1	LOC1001340 73	PREDICTED: Homo sapiens similar to LYPDC1 protein (LOC100134073), mRNA.
NM_014391.2	ANKRD1	Homo sapiens ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) (ANKRD1), mRNA.
NM_00101339 8.1	IGFBP3	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 1, mRNA.
NM_005159.4	ACTC1	Homo sapiens actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA.
NM_001300.4	KLF6	Homo sapiens Kruppel-like factor 6 (KLF6), transcript variant 2, mRNA.
NM_013352.2	DSE	Homo sapiens dermatan sulfate epimerase (DSE), transcript variant 1, mRNA.
NM_00101736 9.1	SC4MOL	Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), transcript variant 2, mRNA.
NM_016357.3	LIMA1	Homo sapiens LIM domain and actin binding 1 (LIMA1), mRNA.
NM_004619.3	TRAF5	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 5 (TRAF5), transcript variant 1, mRNA.
NM_002006.3	FGF2	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA.
NM_213674.1	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2 (beta) (TPM2), transcript variant 2, mRNA.
NM_016205.1	PDGFC	Homo sapiens platelet derived growth factor C (PDGFC), mRNA.
NM_002840.3	PTPRF	Homo sapiens protein tyrosine

		phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1, mRNA.
NM_032199.1	ARID5B	Homo sapiens AT rich interactive domain 5B (MRF1-like) (ARID5B), mRNA.
NM_177964.3	LYPD6B	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 6B (LYPD6B), mRNA.
NM_152522.3	ARL6IP6	Homo sapiens ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 6 (ARL6IP6), mRNA.
NM_001233.3	CAV2	Homo sapiens caveolin 2 (CAV2), transcript variant 1, mRNA.
NM_00113503 2.1	FAM176A	Homo sapiens family with sequence similarity 176, member A (FAM176A), transcript variant 1, mRNA.
NM_003131.2	SRF	Homo sapiens serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor) (SRF), mRNA.
NM_002353.1	TACSTD2	Homo sapiens tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2), mRNA.
NM_006851.2	GLIPR1	Homo sapiens GLI pathogenesis-related 1 (GLIPR1), mRNA.
NM_00113503 2.1	FAM176A	Homo sapiens family with sequence similarity 176, member A (FAM176A), transcript variant 1, mRNA.
NM_013253.4	DKK3	Homo sapiens dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (DKK3), transcript variant 2, mRNA.
NM_004670.3	PAPSS2	Homo sapiens 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 (PAPSS2), transcript variant 1, mRNA.
NM_001839.2	CNN3	Homo sapiens calponin 3, acidic (CNN3), mRNA.
NM_014452.3	TNFRSF21	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21), mRNA.
NM_024429.1	PRKAG2	Homo sapiens protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit (PRKAG2), transcript variant b, mRNA.
NM_007085.3	FSTL1	Homo sapiens follistatin-like 1 (FSTL1), mRNA.
NM_007350.3	PHLDA1	Homo sapiens pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1), mRNA.
NM_001102.2	ACTN1	Homo sapiens actinin, alpha 1 (ACTN1),

NM_021034.2	IFITM3	mRNA. Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3), mRNA.
NM_020440.2	PTGFRN	Homo sapiens prostaglandin F2 receptor negative regulator (PTGFRN), mRNA.
NM_001924.2	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.
NM_001165.3	BIRC3	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1, mRNA.
NM_000527.2	LDLR	Homo sapiens low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) (LDLR), mRNA.
NM_000165.3	GJA1	Homo sapiens gap junction protein, alpha 1, 43kDa (GJA1), mRNA.
NM_138370.2	PKDCC	Homo sapiens protein kinase domain containing, cytoplasmic homolog (mouse) (PKDCC), mRNA.
NM_001709.3	BDNF	Homo sapiens brain-derived neurotrophic factor (BDNF), transcript variant 4, mRNA.
NM_004428.2	EFNA1	Homo sapiens ephrin-A1 (EFNA1), transcript variant 1, mRNA.
NM_000104.2	CYP1B1	Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA.
NM_002084.3	GPX3	Homo sapiens glutathione peroxidase 3 (plasma) (GPX3), mRNA.
NM_198402.2	PTPLB	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b (PTPLB), mRNA.
NM_002356.5	MARCKS	Homo sapiens myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS), mRNA.
NM_001259.5	CDK6	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA.
NM_018192.2	LEPREL1	Homo sapiens leprecan-like 1 (LEPREL1), mRNA.
NM_006745.3	SC4MOL	Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), transcript variant 1, mRNA.
NM_005876.3	APEG1	Homo sapiens aortic preferentially expressed gene 1 (APEG1), mRNA.
NM_012250.3	RRAS2	Homo sapiens related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2 (RRAS2), mRNA.
NM_012228.2	MSRB2	Homo sapiens methionine sulfoxide reductase B2 (MSRB2), mRNA.

NM_00104248 3.1	NUPR1	Homo sapiens nuclear protein, transcriptional regulator, 1 (NUPR1), transcript variant 1, mRNA.
NM_001360.2	DHCR7	Homo sapiens 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7), transcript variant 1, mRNA.
NM_00104253 5.1	AGAP3	Homo sapiens ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3 (AGAP3), transcript variant 2, mRNA.
NM_173515.2	CNKSR3	Homo sapiens CNKSR family member 3 (CNKSR3), mRNA.
NM_005168.3	RND3	Homo sapiens Rho family GTPase 3 (RND3), mRNA.
NM_001360.1	DHCR7	Homo sapiens 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7), mRNA.
XM_939781.1	LOC650695	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC650695 (LOC650695), mRNA.
NM_004120.3	GBP2	Homo sapiens guanylate binding protein 2, interferon-inducible (GBP2), mRNA.

**7- Hela shNE non traitées versus Hela shHRI non traitées
Fold Change supérieur à 2.1**

RefSeq	Gene	Nom du gène
NM_001958.2	EEF1A2	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (EEF1A2), mRNA.
NM_016724.1	FOLR1	Homo sapiens folate receptor 1 (adult) (FOLR1), transcript variant 7, mRNA.
NM_002462.2	MX1	Homo sapiens myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) (MX1), mRNA.
NM_001003683.1	PDE1A	Homo sapiens phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent (PDE1A), transcript variant 2, mRNA.
NR_002795.2	HOXA11AS	Homo sapiens HOXA11 antisense RNA (non-protein coding) (HOXA11AS), antisense RNA.
NM_003881.2	WISP2	Homo sapiens WNT1 inducible signaling pathway protein 2 (WISP2), mRNA.
NM_001040129.2	SPINK5L3	Homo sapiens serine protease inhibitor Kazal-type 5-like 3 (SPINK5L3), mRNA.
NM_153282.1	HYAL1	Homo sapiens hyaluronoglucosaminidase 1 (HYAL1), transcript variant 2, mRNA.
NM_021992.2	TMSB15A	Homo sapiens thymosin beta 15a (TMSB15A), mRNA.
NM_004988.4	MAGEA1	Homo sapiens melanoma antigen family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E) (MAGEA1), mRNA.
NM_006869.1	CENTA1	Homo sapiens centaurin, alpha 1 (CENTA1), mRNA.
NM_033260.3	FOXQ1	Homo sapiens forkhead box Q1 (FOXQ1), mRNA.
NM_001098411.1	LOC645037	Homo sapiens similar to GAGE-2 protein (G antigen 2) (LOC645037), mRNA.
NM_018951.3	HOXA10	Homo sapiens homeobox A10 (HOXA10), transcript variant 1, mRNA.
NM_194272.1	RBPMS2	Homo sapiens RNA binding protein with multiple splicing 2 (RBPMS2), mRNA.
NM_001039966.1	GPER	Homo sapiens G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER), transcript variant 3, mRNA.
NM_001475.1	GAGE5	Homo sapiens G antigen 5 (GAGE5), mRNA.
NM_016229.3	CYB5R2	Homo sapiens cytochrome b5 reductase 2

		(CYB5R2), mRNA.
NM_001475.1	GAGE5	Homo sapiens G antigen 5 (GAGE5), mRNA.
NM_001458.3	FLNC	Homo sapiens filamin C, gamma (actin binding protein 280) (FLNC), mRNA.
NM_153715.2	HOXA10	Homo sapiens homeobox A10 (HOXA10), transcript variant 2, mRNA.
NM_000402.3	G6PD	Homo sapiens glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), transcript variant 1, mRNA.
NM_024087.1	ASB9	Homo sapiens ankyrin repeat and SOCS box-containing 9 (ASB9), transcript variant 2, mRNA.
NM_016818.2	ABCG1	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1 (ABCG1), transcript variant 2, mRNA.
NM_194324.1	MGC39900	Homo sapiens hypothetical protein MGC39900 (MGC39900), mRNA.
NM_194286.2	SRRM4	Homo sapiens serine/arginine repetitive matrix 4 (SRRM4), mRNA.
NM_017843.3	BCAS4	Homo sapiens breast carcinoma amplified sequence 4 (BCAS4), transcript variant 1, mRNA.
NM_015656.1	KIF26A	Homo sapiens kinesin family member 26A (KIF26A), mRNA.
NM_018242.2	SLC47A1	Homo sapiens solute carrier family 47, member 1 (SLC47A1), mRNA.
AF038185		Homo sapiens clone 23700 mRNA sequence
NM_174941.4	CD163L1	Homo sapiens CD163 molecule-like 1 (CD163L1), mRNA.
NM_024087.1	ASB9	Homo sapiens ankyrin repeat and SOCS box-containing 9 (ASB9), transcript variant 2, mRNA.
NM_006123.2	IDS	Homo sapiens iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome) (IDS), transcript variant 2, mRNA.
XM_932965.2	LOC645553	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC645553 (LOC645553), mRNA.
NM_004091.2	E2F2	Homo sapiens E2F transcription factor 2 (E2F2), mRNA.
NM_001875.2	CPS1	Homo sapiens carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial (CPS1),

		mRNA.
NM_000339.1	SLC12A3	Homo sapiens solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters), member 3 (SLC12A3), mRNA.
NM_005189.1	CBX2	Homo sapiens chromobox homolog 2 (Pc class homolog, Drosophila) (CBX2), transcript variant 1, mRNA.
NM_000476.1	AK1	Homo sapiens adenylate kinase 1 (AK1), mRNA.
NM_012083.2	FRAT2	Homo sapiens frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2 (FRAT2), mRNA.
NM_001018111.1	PODXL	Homo sapiens podocalyxin-like (PODXL), transcript variant 1, mRNA.
NM_207310.1	CCDC74B	Homo sapiens coiled-coil domain containing 74B (CCDC74B), mRNA.
NM_002876.2	RAD51C	Homo sapiens RAD51 homolog C (S. cerevisiae) (RAD51C), transcript variant 2, mRNA.
NM_017681.1	NUP62CL	Homo sapiens nucleoporin 62kDa C-terminal like (NUP62CL), mRNA.
XM_939056.2	LOC649970	PREDICTED: Homo sapiens similar to creatine kinase, mitochondrial 1B precursor (LOC649970), mRNA.
NM_001006639.1	TCEAL1	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII)-like 1 (TCEAL1), transcript variant 2, mRNA.
NM_031426.2	AIF1L	Homo sapiens allograft inflammatory factor 1-like (AIF1L), transcript variant 1, mRNA.
NM_001024211.1	S100A13	Homo sapiens S100 calcium binding protein A13 (S100A13), transcript variant 3, mRNA.
NM_139215.1	TAF15	Homo sapiens TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa (TAF15), transcript variant 1, mRNA.
NM_005567.2	LGALS3BP	Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein (LGALS3BP), mRNA.
NM_002522.2	NPTX1	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA.
NM_001006684.1	TCEAL8	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII)-like 8 (TCEAL8), transcript variant 2, mRNA.
NM_005318.2	H1FO	Homo sapiens H1 histone family, member 0 (H1FO), mRNA.
NM_001375.2	DNASE2	Homo sapiens deoxyribonuclease II, lysosomal (DNASE2), mRNA.

NM_021800.2	DNAJC12	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 (DNAJC12), transcript variant 1, mRNA.
NR_004400.1	RNU1-5	Homo sapiens RNA, U1 small nuclear 5 (RNU1-5), small nuclear RNA.
NM_032290.2	ANKRD32	Homo sapiens ankyrin repeat domain 32 (ANKRD32), mRNA.
NM_005308.2	GRK5	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5), mRNA.
NM_001034850.1	FAM134B	Homo sapiens family with sequence similarity 134, member B (FAM134B), transcript variant 1, mRNA.
NM_004434.2	EML1	Homo sapiens echinoderm microtubule associated protein like 1 (EML1), transcript variant 2, mRNA.
NM_001017978.1	CXorf61	Homo sapiens chromosome X open reading frame 61 (CXorf61), mRNA.
NM_022786.1	ARV1	Homo sapiens ARV1 homolog (S. cerevisiae) (ARV1), mRNA.
NM_004695.2	SLC16A5	Homo sapiens solute carrier family 16, member 5 (monocarboxylic acid transporter 6) (SLC16A5), mRNA.
NM_005398.4	PPP1R3C	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C (PPP1R3C), mRNA.

Annexe 2 : Publications et communications scientifiques

- Autres publications :

Analysis of translation initiation by polysome profile analysis

Coudert L*, Adjibade P*, Mazroui R. (*first co-authors)

Journal of Visualized Experiments, 25 January 2014.

Contribution: First, I develop and optimized this technic for the laboratory. Then, for this work, I wrote the protocol, the results, the discussion and the materials table. I designed and performed the experiments for the representative results (polysome profiles). I designed and helped in the others experiments. I participated to the revision and correction of the manuscript.

Stress granules : a matter of life and death

Coudert L, et Mazroui R.

Médecine Sciences Amérique. Online review.

Contribution: I entirely wrote the whole manuscript under supervision of my thesis director.

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

Gareau C, Martel D, Coudert L, Mellaoui S, Mazroui R.

Biol Open. 2013 Jan 15; 2(1):68-81. doi: 10.1242/bio.20123012.

Contribution: I participated to the design and performed all the experiments from the figures 5 and 6. I helped in the performance of the others experiments and during the revision and correction of the manuscript.

Characterization of fragile X mental retardation protein recruitment and dynamics in Drosophila stress granules.

Gareau C, Houssin E, Martel D, Coudert L, Mellaoui S, Huot ME, Laprise P, Mazroui R.

PLoS One. 2013; 8(2):e55342. doi: 10.1371/journal.pone.0055342. Epub 2013 Feb 7.

Contribution: I participated to the design and performed the experiments from the figures 1A and 1B. I helped in the performance of the others experiments and during the revision and correction of the manuscript.

p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to Bortezomib-mediated apoptosis.

Gareau C, Fournier MJ, Filion C, Coudert L, Martel D, Labelle Y, Mazroui R.

PLoS One. 2011; 6(5):e20254. doi: 10.1371/journal.pone.0020254.

Contribution: I helped in the revision and correction of the manuscript.