

Université de Sherbrooke

Modulation de l'épissage alternatif de Bcl-x par les protéines
hnRNP F et H *in vitro*

Par Daniel Garneau
Département de microbiologie et d'infectiologie
Laboratoire du docteur Benoit Chabot

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)

décembre 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 0-494-05911-7
Our file *Notre référence*
ISBN: 0-494-05911-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	I
Liste des schémas et des figures.....	III
Liste des abréviations	IV
Résumé	VI
Introduction	1
L'épissage dans toute sa complexité	1
Les méthodes de modulation de l'épissage alternatif.....	5
Les protéines SR, modulatrices de l'épissage alternatif.....	8
L'implication des protéines hnRNP dans l'épissage alternatif.....	9
L'épissage alternatif et l'apoptose.....	16
Le gène apoptotique Bcl-x.....	20
Matériel et méthodes	27
Constructions plasmidiques.....	27
Transcription in vitro	30
Épissage in vitro	30
Amplification des produits d'épissage par RT-PCR	31
Production de protéines recombinantes.....	31
Gel de protéines	33
Immunobuvardage de type Western.....	33
Marquage des oligos.....	34
Gel de retardement	35

Séquence des oligonucléotides d'ADN	35
Résultats	37
A. Le premier 1,2 kb de l'intron 2 de Bcl-x ne semble pas contenir d'éléments régulateurs de l'épissage de Bcl-x.....	37
B. Deux régions modulent le choix des sites d'épissage 5' de Bcl-x	42
C. Une sous-région de B2 est responsable de l'activité de cet élément	48
D. La région B2G possède une séquence riche en G pouvant lier les protéines hnRNP F et H	51
E. La dernière série de G de l'élément B2G est importante pour la liaison des protéines hnRNP F et H.....	56
F. Les deux dernières séries de G de l'élément B2G sont essentielles pour son activité dans l'épissage	57
G. L'épissage in vitro de Bcl-x peut être modulé par l'ajout de protéines hnRNP F et H recombinantes	59
H. L'effet de his-hnRNP F sur l'épissage de Bcl-x se ferait via l'élément B2G..	63
Discussion	66
Remerciements	78
Références	79

Liste des schémas et figures

Schéma 1	2
Schéma 2	3
Schéma 3	4
Schéma 4	6
Schéma 5	10
Schéma 6	12
Schéma 7	19
Schéma 8	20
Schéma 9	22
Schéma 10	25
Figure 1	38
Figure 2	40
Figure 3	43
Figure 4	46
Figure 5	48
Figure 6	50
Figure 7	53
Figure 8	55
Figure 9	58
Figure 10	61
Figure 11	64

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNsb	ADN simple brin
ARN	Acide Ribonucléique
Bcl	« B cell lymphoma »
BH	« Bcl-2 homology »
ARNm	ARN messenger
DCS	« Downstream control sequence »
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Éthylènediaminetétracétate
HEPES	Acide 4-2-hydroxyéthyl-1-piperazineéthanesulfonic
His	Étiquette 6 x histidine
hnRNP	« heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein »
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
M	Molaire (moles / litre)
nt	Nucléotides
N-terminal	Amino-terminal
NE	« Nuclear Extract »

Oligo	Oligonucléotide
pb	Paires de bases
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Pré-ARNm	ARN messenger précurseur
PTB	« Polypyrimidine tract binding protein »
RRM	« RNA recognition motif »
RT	« Reverse Transcription »
SDS	Sodium dodécyl sulfate
snRNA	« small nuclear RNA »
snRNP	« small nuclear Ribonucleoprotein »
SR	Sérine-Arginine
U2AF	« U2 auxiliary factor »

Résumé

L'épissage alternatif est un mécanisme permettant d'augmenter la diversité protéique dans une cellule. Dans certains cas, les isoformes ainsi créés peuvent avoir des activités complètement différentes. Une telle situation implique le gène apoptotique Bcl-x qui produit des isoformes ayant des activités antagonistes dans l'apoptose. Ces isoformes sont formés par l'utilisation de sites d'épissage 5' alternatifs. L'isoforme Bcl-x_L possède une activité anti-apoptotique alors que Bcl-x_S possède une activité pro-apoptotique. Mes recherches ont permis de trouver deux régions exoniques responsables de la régulation de l'épissage alternatif de ce gène. Une première région B2, située en aval du site d'épissage de Bcl-x_S, active la formation de l'isoforme Bcl-x_S alors qu'une deuxième région B3, située en amont du site d'épissage de Bcl-x_L, active la formation de l'isoforme Bcl-x_L. Plus précisément, une sous-région B2G est principalement responsable de l'activité de la région B2 et possède une séquence constituée de trois séries de G pouvant recruter les protéines hnRNP F et hnRNP H. De plus, les deux dernières séries de G sont importantes pour l'activité de l'élément B2G ainsi que pour la liaison des protéines à cette séquence. Nous avons aussi montré que l'ajout de hnRNP F ou H dans une réaction d'épissage *in vitro* permet de moduler l'épissage de Bcl-x en favorisant la formation de l'isoforme Bcl-x_S. Cette modulation n'est cependant pas obtenue lorsque que l'élément B2G est muté. Mon étude montre aussi que, *in vitro*, l'ajout des protéines hnRNP A1 et SRp30c stimule la production de l'isoforme Bcl-x_L. Cet effet se ferait via un autre élément que B2G puisque ni hnRNP A1, ni SRp30c ne lient cette séquence.

Introduction

L'épissage dans toute sa complexité

Chez les organismes eucaryotes, les ARN pré-messagers (pré-ARNm) produits doivent subir plusieurs modifications post-transcriptionnelles avant d'être finalement traduits en protéines. Parmi ces modifications, on retrouve l'ajout d'une coiffe en 5', l'édition de certains nucléotides, l'épissage de l'ARN ainsi qu'une coupure et la polyadénylation à l'extrémité 3'. L'épissage des pré-ARNm est la modification qui consiste à supprimer du pré-ARNm certaines régions nommées introns et joindre les exons qui, une fois rassemblés, formeront l'ARNm mature. Ce mécanisme est le résultat de deux réactions de transesterification catalysées par une machinerie nommée le spliceosome. Cette dernière est principalement constituée de petites particules ribonucléiques nucléaires, soit les snRNPs U1, U2, U4, U5 et U6, chacun composé de plusieurs protéines et d'un petit ARN nommé snRNA. En plus des U snRNPs, une cinquantaine de protéines indépendantes, dont des protéines à domaine sérine-arginine (protéines SR) et des hélicases à ARN forment le spliceosome.

L'assemblage de cette machinerie sur le pré-ARNm se fait en plusieurs étapes successives (schéma 1). La première étape consiste à reconnaître les jonctions exon-intron nommées les sites d'épissage 5' et 3'. La séquence du site d'épissage 5' est reconnue par le snRNP U1 qui se lie à ce site via le snRNA U1 (Mount et al., 1983;

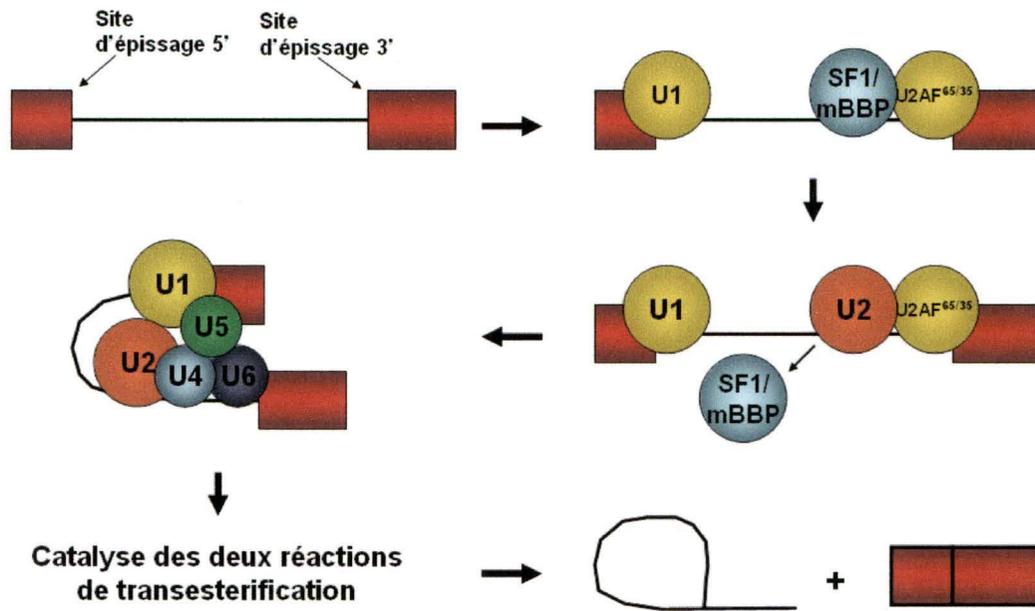


Schéma 1. Assemblage du spliceosome sur un pré-ARNm. Les lignes correspondent aux introns et les boîtes aux exons.

Rosbash et Seraphin, 1991). Quant au site d'épissage 3', il est reconnu par l'hétérodimère U2AF^{65/35} qui se lie à la fois au site d'épissage 3' et à une séquence riche en pyrimidines retrouvée en amont de ce site (Zamore et Green, 1989; Zamore et al., 1992). Le site de branchement est initialement reconnu par la protéine SF1/mBBP dont l'interaction à ce site est stabilisée par l'interaction de cette protéine avec U2AF^{65/35} (Berglund et al., 1998; Berglund et al., 1997). Par la suite, le snRNP U2 viendrait se lier au site de branchement via une interaction ARN-ARN en déplaçant SF1/mBBP. Suivant cette étape, le tri-snRNP U4/U5/U6 viendrait s'associer au spliceosome, ce qui provoquerait un remodelage du pré-ARNm lui donnant une structure propice pour effectuer les deux réactions de transesterification permettant d'accomplir l'épissage de l'ARN (Ares et Weiser, 1995; Nilsen, 1994).

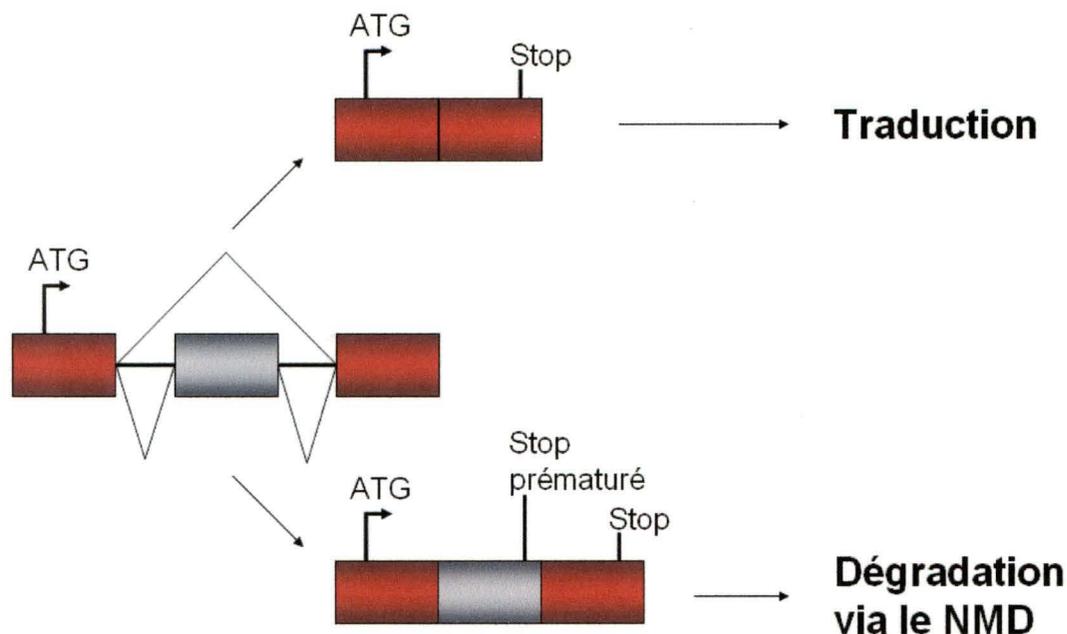


Schéma 2. Contrôle de l'expression d'un gène par épissage alternatif affectant la stabilité d'un ARNm.

Chez les eucaryotes supérieurs, certains exons ou portions d'exons peuvent parfois être inclus ou exclus de l'ARNm mature et certains introns peuvent être retenus. Ce processus nommé épissage alternatif permet de former plusieurs ARNm à partir d'un seul type de pré-ARNm. Le principal avantage de ce mécanisme est d'augmenter la quantité et la diversité protéique dans une cellule. L'épissage alternatif peut aussi servir à contrôler l'expression de certains gènes en changeant, selon les exons inclus ou exclus, la stabilité de l'ARNm mature (schéma 2). En effet, l'inclusion ou l'exclusion de certains exons peut, dans certains cas, engendrer l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré dans l'ARNm qui sera par la suite susceptible d'être dégradé via la voie du NMD (nonsense-mediated RNA decay) (Lewis et al., 2003; Wollerton et al., 2004).

Les exons alternatifs peuvent se présenter sous plusieurs configurations (schéma 3). Un exon alternatif peut être un exon cassette où, dans ce cas, il sera flanqué de deux introns et possédera des sites d'épissage 3' et 5' distincts. Une compétition entre deux sites d'épissage alternatifs (5' ou 3') peut aussi permettre l'inclusion ou l'exclusion dans l'ARNm mature d'une partie supplémentaire d'un exon. La rétention d'un intron peut aussi se produire dans le cas où un intron, situé entre deux exons constitutifs, est conservé dans l'ARNm mature. Un autre cas plus complexe, les exons mutuellement exclusifs, se produit lorsqu'il y a présence de deux exons alternatifs et où, uniquement un des deux exons à la fois est inclus dans l'ARNm mature.

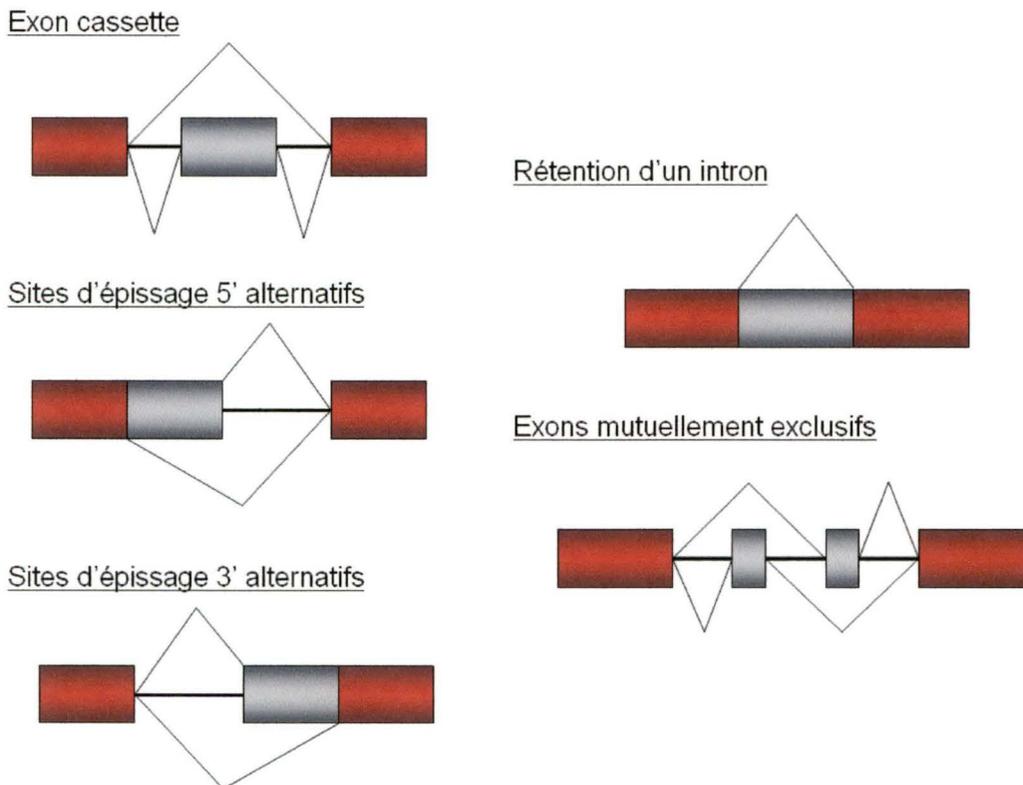


Schéma 3. Représentation des différents types d'exons alternatifs pouvant être retrouvés dans les pré-ARNm.

Chez l'homme, l'épissage alternatif est plutôt la norme que l'exception puisqu'il est aujourd'hui évalué qu'environ 74 % des gènes humains multi-exoniques subiraient au moins un événement d'épissage alternatif (Johnson et al., 2003). Il y a donc plusieurs voies ou processus cellulaires qui sont régulés par l'épissage alternatif et un contrôle rigoureux de ce mécanisme permet que les bons isoformes soient formés dans les bonnes circonstances. Certains gènes épissés alternativement peuvent engendrer une très grande variété d'isoformes dont l'exemple le mieux connu est le gène Dscam, chez la drosophile, qui pourrait engendrer jusqu'à 38 000 isoformes différents (Schmucker et al., 2000). Les isoformes résultant de l'épissage alternatif peuvent avoir des activités complètement différentes. Le gène Bcl-x par exemple peut former, par épissage alternatif, deux protéines différentes, Bcl-x_L et Bcl-x_S, qui possèdent respectivement une activité anti-apoptotique et pro-apoptotique (Boise et al., 1993). Aussi, l'épissage alternatif du récepteur Fas peut permettre de faire varier la localisation cellulaire des différents isoformes en engendrant soit des protéines cytoplasmiques, soit des protéines membranaires (Cascino et al., 1995).

Les méthodes de modulation de l'épissage alternatif

Plusieurs stratégies de modulation de l'épissage alternatif sont utilisées par la cellule afin d'activer ou de réprimer l'utilisation de sites d'épissage alternatif. Un premier facteur pouvant influencer l'épissage alternatif est la force des sites d'épissage 5' et 3'

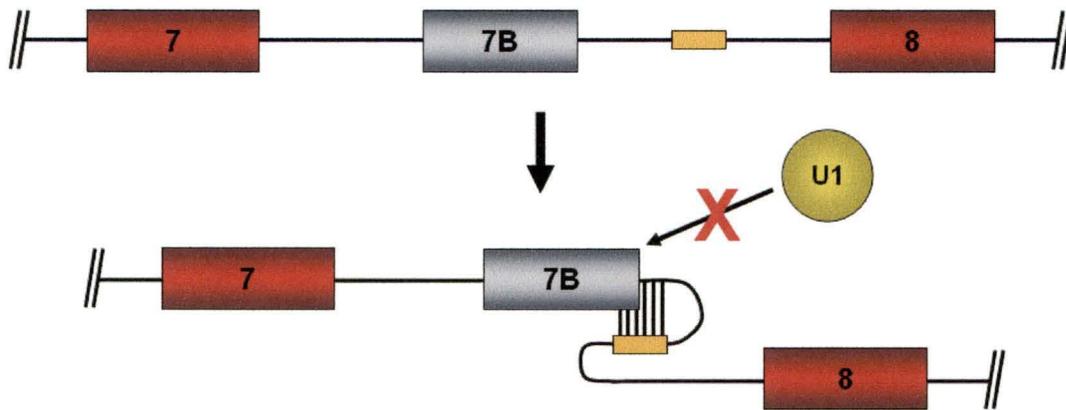


Schéma 4. Contrôle de l'épissage alternatif du pré-ARNm de hnRNP A1 par la formation d'une structure secondaire.

présents sur le pré-ARNm ou leur capacité à lier les facteurs snRNP U1 ou U2AF^{65/35}. En effet, plus un site d'épissage recrute aisément un ou l'autre de ces facteurs, plus il sera utilisé fréquemment favorisant ainsi l'inclusion ou l'exclusion de certains exons alternatifs. Un second facteur pouvant influencer l'épissage alternatif est la structure secondaire que prend le pré-ARNm qui sera épissé. En effet, il est connu que certains ARNs peuvent adopter une structure diminuant l'utilisation d'un site d'épissage ou d'un élément régulateur de l'épissage. Un tel événement se produit entre autre sur le pré-ARNm de hnRNP A1 qui possède un exon cassette alternatif 7B situé entre les exons 7 et 8 (schéma 4). Une séquence intronique (CE6) située entre les exons 7B et 8 montre une complémentarité importante avec le site d'épissage 5' de l'exon 7B. L'hybridation de cette séquence au site d'épissage empêche la liaison du snRNP U1 à ce site favorisant ainsi l'exclusion de l'exon 7B (Blanchette et Chabot, 1997).

Aussi, de plus en plus d'évidences suggèrent qu'un couplage existe entre la régulation de l'épissage alternatif et la transcription (Cramer et al., 1997). Le mécanisme par

lequel une telle modulation est possible demeure cependant mal compris. Une hypothèse propose que cette modulation pourrait être due au recrutement par le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II de facteurs d'épissage différents selon le promoteur utilisé pour la transcription du gène. Il fut en effet démontré que le pré-ARNm du gène de la fibronectine, l'inclusion d'un exon alternatif EDI est activé par les protéines SR ASF/SF2 et 9G8 et que la présence du CTD lors de la transcription est essentielle au recrutement de ces facteurs à leur site de liaison. De plus, le type de promoteur utilisé influence le recrutement de ces protéines à leur site de haute affinité (Cramer et al., 1999). Comme la vitesse de transcription peut varier selon le promoteur utilisé et que l'ARN polymérase II peut faire des pauses à certains endroits lorsqu'elle transcrit, une hypothèse suggère que la processivité de l'ARN polymérase permettrait d'affecter la sélection des sites d'épissage. En effet, si la vitesse de transcription est lente ou que l'ARN polymérase fait des pauses lors de la transcription, ceci laisse un plus grand temps pour la formation de structures secondaires ou pour le recrutement de facteurs régulateurs sur l'ARN. Il fut montré sur le pré-ARNm de l' α -tropomyosine que l'ajout de sites provoquant des pauses de l'ARN polymérase II lors de la transcription favorise l'utilisation d'un élément régulateur DRE qui provoque l'exclusion de l'exon 3 de ce pré-ARNm (Roberts et al., 1998).

La méthode de régulation de l'épissage alternatif la mieux connue consiste au recrutement de facteurs *trans*, ayant la capacité de moduler l'épissage, à des sites spécifiques sur le pré-ARNm nommés éléments *cis*. Ceux-ci peuvent être localisés

aussi bien dans un exon que dans un intron et peuvent agir en activant l'utilisation d'un site d'épissage (respectivement « exonic splicing enhancer » (ESE) et « intronic splicing enhancer » (ISE)) ou en inhibant son utilisation (« exonic splicing silencer » (ESS) et « intronic splicing silencer » (ISS)). Plusieurs protéines sont aujourd'hui connues pour pouvoir se lier à des pré-ARNm et moduler leur épissage (exemple : les protéines SR, les protéines hnRNPs, TIA-1, les protéines à domaine KH, etc.). Parmi celles-ci, les protéines les mieux connues et les plus étudiées sont les protéines SR et hnRNPs.

Les protéines SR, modulatrices de l'épissage alternatif

La famille des protéines SR est constituée d'environ dix membres qui sont, de manière générale, reconnus pour promouvoir la sélection des sites d'épissage proximaux (Fu, 1995; Horowitz et Krainer, 1994). Plus spécifiquement, les protéines SR peuvent aussi agir comme des régulateurs de certains sites d'épissage alternatifs en liant des éléments *cis* situés à proximité des sites d'épissage. Ces protéines sont généralement constituées de un ou deux domaines RRM qui sont responsables de la liaison à l'ARN en reconnaissant une séquence de façon plus ou moins spécifique et d'un domaine riche en sérines et arginines (domaine SR) qui permettrait l'interaction avec d'autres protéines possédant un tel domaine (Graveley, 2000). Plusieurs études ont démontré que des éléments exoniques liés par des protéines SR permettaient d'activer l'utilisation d'un site d'épissage 5' (Bourgeois et al., 1999; Côté et al., 1999;

Ryner et al., 1996; Selvakumar et Helfman, 1999). Un de ces éléments est retrouvé sur le pré-ARNm du gène NCAM qui possède un exon alternatif E18. Cet élément situé dans l'exon E17, lorsque lié par une protéine SR, favorise l'utilisation du site d'épissage 5' de l'exon E17 au détriment de celui de l'exon E18 et permet ainsi d'augmenter le niveau d'exclusion de l'exon E18 dans l'ARNm (Côté et al., 1999). D'autres études suggèrent que l'activation d'un site d'épissage 5' par les protéines SR serait possible grâce au recrutement du snRNP U1 au site d'épissage et ce, via une interaction entre les domaines RS de la protéine SR activatrice et celui de la protéine U1-70K qui fait partie intégrante du complexe snRNP U1 (Jamison et al., 1995; Kohtz et al., 1994).

Les protéines SR ont aussi la faculté de moduler positivement (Black, 2003; Graveley, 2000) ou négativement (Simard et Chabot, 2002) la sélection de sites d'épissage 3'. Comme il est connu que le domaine RS des protéines SR peut interagir avec celui de la protéine U2AF⁶⁵, il est possible que l'activation d'un site d'épissage 3' puisse être causée par le recrutement du dimère U2AF^{65/35} au site d'épissage 3' par une protéine SR liée à un élément *cis* situé près de ce site (Wu et Maniatis, 1993).

L'implication des protéines hnRNP dans l'épissage alternatif

Les protéines hnRNPs forment une deuxième famille de protéines dont certaines sont impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif. Cette famille de protéines,

composée d'une vingtaine de facteurs (Mayeda et al., 1994), est généralement connue pour antagoniser l'effet positif des protéines SR sur l'épissage alternatif (Mayeda et Krainer, 1992; Yang et al., 1994). La protéine la plus étudiée de cette famille est la protéine hnRNP A1. Cette dernière est constituée de deux domaines RRM lui permettant de lier l'ARN (Buvoli et al., 1990; Merrill et al., 1988) ainsi que d'un domaine riche en glycine pouvant interagir avec d'autres protéines possédant un tel domaine (Cartegni et al., 1996). Plusieurs exemples sont connus où un élément intronique lié par hnRNP A1 est responsable de la modulation d'un site d'épissage alternatif. La protéine hnRNP A1 est entre autre connue pour réguler l'épissage alternatif de l'exon 7B de son propre pré-ARNm. L'exclusion de cet exon permet la formation de la protéine hnRNP A1, alors que son inclusion permet la formation de la

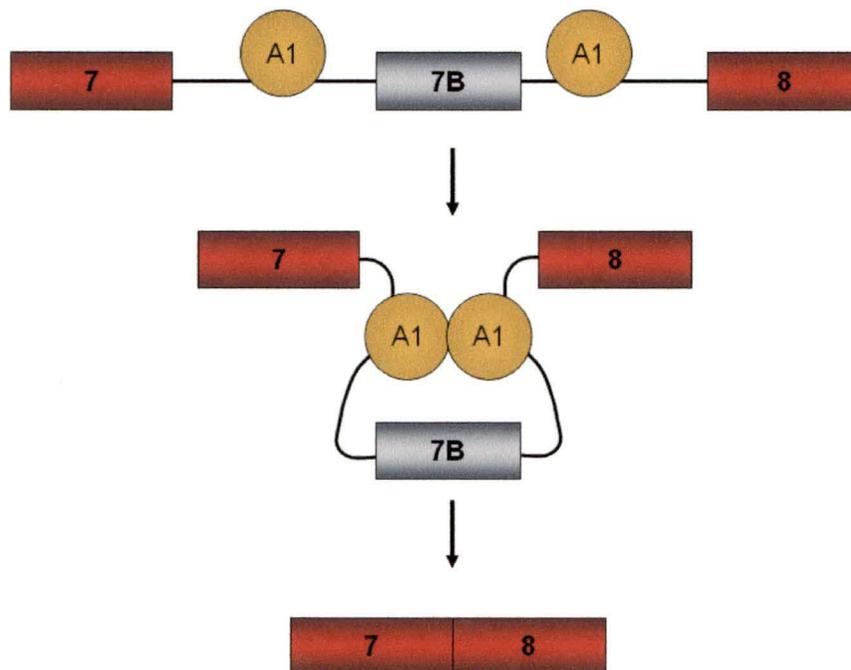


Schéma 5. Exclusion de l'exon 7B causée par la liaison de la protéine hnRNP A1 par le modèle de « looping out ».

protéine hnRNP A1B (Buvoli et al., 1990). Ce pré-ARNm possède des séquences de haute affinité pour la protéine hnRNP A1 dans chaque intron flanquant l'exon 7B et la liaison de cette protéine à ces séquences favorise l'exclusion de l'exon alternatif (Blanchette et Chabot, 1999; Chabot et al., 1997; Hutchison et al., 2002). Un modèle suggéré pour expliquer l'exclusion de l'exon 7B par la liaison des protéines hnRNP A1, est le modèle du « looping out » (schéma 5). Ce modèle propose que des protéines hnRNP A1 liées dans les introns flanquant l'exon 7B formeraient, en interagissant via leur domaine riche en glycines, une boucle qui rapprocherait le site d'épissage 5' de l'exon 7 du site d'épissage 3' de l'exon 8, ce qui favoriserait l'exclusion de l'exon 7B (Blanchette et Chabot, 1999; Nasim et al., 2002). Cette protéine pourrait aussi agir via d'autres mécanismes. Par exemple, la protéine hnRNP A1 est aussi connue pour moduler l'épissage du gène *tat* du virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) en liant un élément situé dans l'intron 1 provoquant l'inclusion de cet intron. La liaison de hnRNP A1 dans cet intron pourrait empêcher, par encombrement stérique la liaison d'un facteur d'épissage snRNP U2, inhibant ainsi l'assemblage du spliceosome à cet endroit (Tange et al., 2001).

La protéine hnRNP A1 peut lier des séquences exoniques et moduler l'exclusion ou l'inclusion de ces exons. Un tel exemple est observé dans l'exon 3 du gène *tat* de VIH-1 où la protéine hnRNP A1 agit en réprimant l'exclusion de cet exon (Zhu et al., 2001). En effet, la liaison de hnRNP A1 à un site de haute affinité empêche, par encombrement stérique, le recrutement de la protéine SR SC35 qui elle, favorise l'inclusion de l'exon 3 dans l'ARNm mature. Le même évènement se produit dans

l'exon 2 de ce gène (Caputi et al., 1999; Zahler et al., 2004). Le gène FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) possède quant à lui un élément nommé S10 dans l'exon K-SAM qui, lorsque lié par hnRNP A1, favorise l'inclusion de cet exon (Del Gatto-Konczak et al., 1999). Le mécanisme par lequel hnRNP A1 favoriserait cette inclusion demeure cependant inconnu.

Les protéines hnRNP H et hnRNP F sont deux autres protéines de la famille des hnRNPs bien connues comme étant des modulateurs de l'épissage alternatif. Ces deux protéines font partie d'une sous-famille de protéines composée des protéines hnRNP F, H, H' et 2H9 pouvant jouer des rôles dans l'épissage des pré-ARNm ainsi que dans la polyadénylation (Arhin et al., 2002; Min et al., 1995; Veraldi et al., 2001). Les deux protéines hnRNP H et F possèdent une séquence en acides aminés identique à 78 % et sont toutes deux formées de trois domaines quasi-RRM (similaires aux domaines RRM retrouvés chez les autres hnRNPs), un domaine riche en glycine-tyrosine-arginine (GYR) ainsi qu'un domaine riche en glycine-tyrosine (Honore et al., 1995) (schéma 6). Les quasi-RRMs permettent aux protéines hnRNP F et H de lier l'ARN via différentes séquences composées de séries de G et il fut déterminé que la séquence

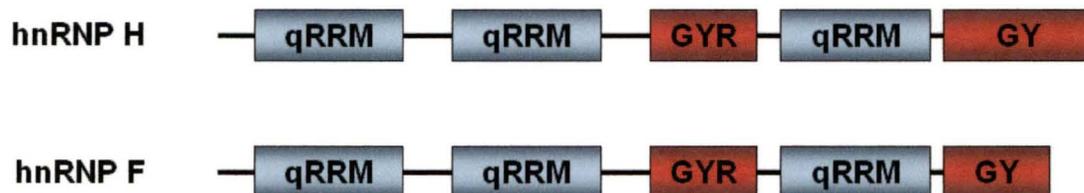


Schéma 6. Principaux domaines des protéines hnRNP F et H.

GGGA semble être la séquence minimale permettant de lier tous les membres de cette sous-famille (Caputi et Zahler, 2001). Il y a cependant plusieurs autres séquences de liaison, toutes constituées d'une ou plusieurs séries de G, qui ont été répertoriées au niveau d'éléments régulateurs de l'épissage ou de polyadénylation (Arhin et al., 2002; Caputi et Zahler, 2002; Chen et al., 1999; Min et al., 1995).

Plusieurs exemples sont connus où les protéines hnRNP F et H peuvent lier des éléments riches en G sur des pré-ARNms afin de moduler leur l'épissage. L'exemple le mieux connu est probablement la régulation de l'exon N1 du gène *c-src* par l'élément DCS (downstream control sequence) (Black, 1992; Chou et al., 1999; Min et al., 1995). L'exon cassette N1, situé entre les exons 3 et 4, est inclus dans l'ARNm mature uniquement dans les cellules neuronales (Levy et al., 1987; Martinez et al., 1987), et l'élément DCS est essentiel pour son inclusion. Une séquence GGGGGUG contenue dans cet élément est importante pour l'inclusion de l'exon N1 et peut être liée par hnRNP H dans plusieurs types cellulaires et par la protéine hnRNP F uniquement dans les cellules neuronales et dans ce cas, avec une plus grande affinité que hnRNP H (Chou et al., 1999; Markovtsov et al., 2000). Il est connu que la présence des deux protéines est importante pour l'inclusion de l'exon N1 et il est possible que ces protéines lient DCS simultanément sous forme d'hétérodimère (Chou et al., 1999). L'élément DCS comporte aussi une séquence riche en pyrimidines pouvant être liée par les facteurs PTB/hnRNP I ou nPTB (un isoforme de PTB retrouvé uniquement dans les cellules neuronales) et la présence d'un de ces facteurs à cet élément favoriserait le recrutement de hnRNP H à ce site. Le mécanisme d'action

par lequel ce complexe de ribonucléoprotéines agit n'est toujours pas élucidé, mais il serait possible que dans les cellules non neuronales, une protéine PTB lié à DCS puisse interagir avec une autre protéine PTB liée dans l'intron en amont de l'exon N1 et, par « looping out », permettent l'exclusion de l'exon alternatif (Markovtsov et al., 2000). Dans les neurones, la présence de nPTB empêcherait la formation de la loupe et l'inclusion de l'exon N1 serait favorisée. Le rôle exact des protéines hnRNP F et H demeure cependant toujours inconnu.

La protéine hnRNP H est aussi impliquée dans l'inclusion de l'exon 6D du gène *env* du VIH-1 (Caputi et Zahler, 2002). En effet, la mutation d'une séquence AGUAG en AGCAG à l'intérieur de l'exon 6D permet le recrutement de la protéine SR SC35 à cet endroit. Ce site de liaison pour SC35 est situé à trois nucléotides d'une séquence GGGA pouvant lier la protéine hnRNP H et la présence des deux protéines dans l'exon 6D engendre le recrutement du snRNP U1 au site d'épissage 5' de cet exon. Le mécanisme d'action permettant l'inclusion de l'exon 6D demeure mal compris, cependant une explication suggérée propose que le recrutement de SC35 dans l'exon 6D provoquerait un changement de conformation du complexe hnRNP H – snRNP U1 qui pourrait par la suite stimuler l'épissage de cette exon (Caputi et Zahler, 2002). L'épissage alternatif de l'exon 7 de la β -tropomyosine, inclus uniquement dans les muscles squelettiques, serait aussi contrôlé par la protéine hnRNP H (Chen et al., 1999). Dans ce cas, la protéine hnRNP H liée au pré-ARNm de ce gène via une région riche en G située dans l'exon 7 près du site d'épissage 3', provoquerait l'exclusion de cet exon. Le mécanisme d'action demeure toujours inconnu, mais il est proposé que la

protéine hnRNP H pourrait agir en bloquant la liaison de protéines SR à des éléments activateurs potentiels se trouvant à proximité du site de liaison pour hnRNP H. D'autre part, une autre étude montre que hnRNP H pourrait bloquer l'utilisation d'un site d'épissage 5' composé de plusieurs G en liant ce dernier et en empêchant la liaison du snRNP U1 au site d'épissage (Buratti et al., 2004). De tels événements furent observés dans les gènes NF-1 et TSH β où la présence d'une mutation ponctuelle au niveau de site d'épissage, soit un changement d'un C pour un G à la position +5, crée un site de haute affinité pour la protéine hnRNP H au niveau du site d'épissage (Buratti et al., 2004). Chez le gène NF-1, cette mutation provoquant un dérèglement de l'épissage engendre une maladie nommée neurofibromatose de type 1 (NF-1) (Baralle et al., 2003) alors que le dérèglement de l'épissage encouru chez TSH β provoque une hypothyroïdie congénitale (Pohlenz et al., 2002).

Malgré une grande ressemblance, les protéines hnRNP F et H n'ont pas toujours la même localisation cellulaire selon les tissus (Honore et al., 2004; Honore et al., 1999). Alors que hnRNP H se retrouve au noyau dans tous les types cellulaires testés jusqu'à présent, hnRNP F se retrouve dans la majorité des cas au niveau du cytoplasme. Dans quelques cas, hnRNP F est retrouvée autant au noyau qu'au cytoplasme (îlots de Langerhans, épithélium de l'endomètre) ou principalement au noyau (épithélium cervical utérin). En plus de la localisation différente, le niveau d'expression de ces protéines varie selon les tissus (Honore et al., 2004). En effet, la protéine hnRNP F se retrouve exprimée en grande quantité dans la plupart des tissus alors que l'expression de hnRNP H semble plus spécifique à certains tissus. Le niveau d'expression ainsi

que la localisation des protéines hnRNP F et H dans les tissus cancéreux sont différents de ceux retrouvés dans les tissus normaux. Dans la plupart des tissus cancéreux, hnRNP F se retrouve souvent exprimée en plus grande quantité et se localise autant au noyau qu'au cytoplasme. Quant à hnRNP H, elle est aussi exprimée en plus grande quantité mais, contrairement à hnRNP F, elle demeure habituellement au noyau (Honore et al., 2004).

De plus, des études plus approfondies sur hnRNP H ont montré que cette protéine pouvait subir des modifications post-traductionnelles qui pourraient changer son activité. Il fut montré que la protéine hnRNP H, mais pas hnRNP F, pouvait subir un clivage protéolytique post-traductionnel produisant un fragment composé des deux premiers RRM de la protéine situés en N-terminal et un autre composé des deux domaines riches en glycines ainsi que du troisième RRM situés en C-terminal (Honore et al., 1999). L'activité de ces produits de clivage n'est toujours pas connue. Il fut de plus observé dans les cellules HL-60 que, lors de l'induction de l'apoptose par un traitement à l'acide rétinoïque ou à l'étoposide, il y a augmentation du niveau de phosphorylation des tyrosines de la protéine hnRNP H (Navakauskiene et al., 2004).

L'épissage alternatif et l'apoptose

Comme mentionné précédemment, l'épissage alternatif permet la synthèse d'isoformes qui peuvent parfois avoir des activités totalement différentes dans une voie cellulaire particulière. L'apoptose est l'une des voies connue pour être influencée par l'épissage alternatif. En effet, plusieurs gènes apoptotiques produisent des isoformes ayant soit des rôles antagonistes (anti ou pro-apoptotique), soit des localisations cellulaires différentes (membranaire, cytoplasmique, etc.) (Akgul et al., 2004; Jiang et Wu, 1999). De plus, certains facteurs d'épissage sont aussi reconnus comme régulateurs de l'apoptose. Un de ces facteurs, TIA-1, aujourd'hui un facteur de régulation de l'épissage reconnu, fut tout d'abord découvert comme étant un activateur de l'apoptose (Tian et al., 1991). Cette protéine constituée de trois RRM est connue pour lier des séries de U situées en aval de sites d'épissage 5' et favoriserait la liaison du snRNP U1 à ce site (Del Gatto-Konczak et al., 2000; Forch et al., 2000). Une des cibles connue de cette protéine est le gène FGFR2 dont l'épissage de l'exon alternatif K-SAM peut être modulé par TIA-1 qui antagonise l'effet de hnRNP A1 décrit plus haut sur cet exon (Del Gatto-Konczak et al., 2000). Une série de U située en aval du site d'épissage 5' de l'exon K-SAM permet le recrutement de cette protéine qui, une fois liée, stabilise la liaison du snRNP U1, favorisant l'inclusion de cet exon alternatif dans l'ARNm mature. L'isoforme produit comportant l'exon K-SAM permettrait de reconnaître des facteurs de croissances différents de la famille FGF (Fibroblast Growth Factor) (Ornitz et al., 1996). TIA-1 peut aussi moduler le choix de sites d'épissage 3' dans le gène du récepteur Fas en favorisant la formation de l'isoforme pro-apoptotique de ce récepteur (Forch et al., 2000). En effet, la liaison de TIA-1 en aval du site d'épissage 5' de l'exon 5 de ce pré-ARNm favorise l'utilisation

du site 3' de l'exon 6 au détriment de celui de l'exon 7. Quoique le mécanisme demeure obscur, il est suggéré que la liaison de la protéine TIA-1 près du site d'épissage 5' pourrait provoquer un changement de conformation dans la structure du snRNP U1 qui favoriserait l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 6. TIA-1 peut aussi réguler l'épissage de son propre pré-ARNm en liant des séquences situées en amont de plusieurs sites d'épissage 5' faibles, soit les exons 5A, 6A et 8A (Le Guiner et al., 2001). L'inclusion de l'un ou l'autre de ces exons provoque l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré qui pourrait engendrer soit la formation d'une protéine tronquée, soit la dégradation de l'ARNm mature via la voie du NMD. Comme la surexpression de TIA-1 dans une cellule favorise l'inclusion de ces exons, il est fort probable que ce mécanisme soit en fait une façon de réguler le niveau d'expression de cette protéine dans une cellule.

D'autres facteurs d'épissage pourraient aussi avoir une implication dans la régulation de l'apoptose puisqu'une surexpression de ces protéines est observée dans des types de cancers ou dans des lignées de cellules cancéreuses. Le facteur d'épissage SPF45, activateur d'un site d'épissage cryptique de la β -globine (Lallena et al., 2002), est surexprimé dans plusieurs types de cancers comme le cancer de la vessie, du sein, du colon, des poumons, du pancréas et de la prostate (Sampath et al., 2003).

Le gène Ich-1 (caspase-2) est un exemple bien connu de gène apoptotique épissé alternativement pouvant produire deux protéines ayant des effets antagonistes dans l'apoptose. La forme courte de la caspase-2 (Casp-2S) possède une activité anti-

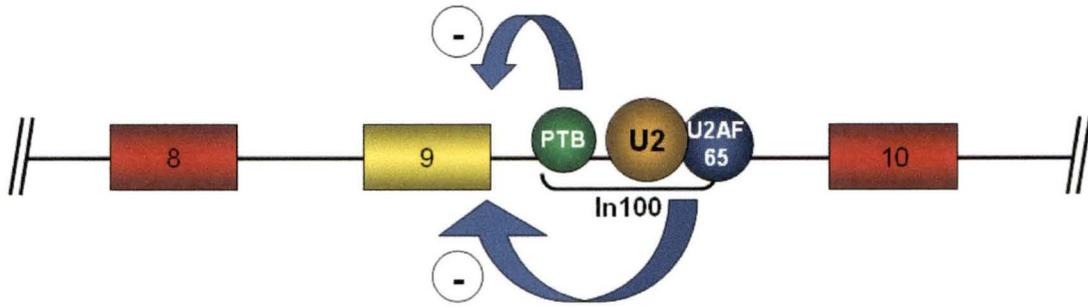


Schéma 7. Régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de Caspase-2 par l'élément In100.

apoptotique alors que la forme longue (Casp-2L) possède une activité pro-apoptotique (Wang et al., 1994). L'inclusion de l'exon 9 dans l'ARNm mature engendre la formation d'un codon d'arrêt prématuré et permet ainsi la formation de l'isoforme Casp-2S, alors que l'exclusion de l'exon 9 permet de former l'isoforme Casp-2L. Il fut démontré *in vivo* que la surexpression de protéines SR comme SC35 ou ASF/SF2 favorise l'exclusion de l'exon 9 alors que la surexpression de la protéine hnRNP A1 permet son inclusion (Jiang et al., 1998). L'épissage de Ich-1 est aussi contrôlé par un élément intronique (In100) situé en aval de l'exon alternatif qui inhibe l'inclusion de cet exon (schéma 7) (Côté et al., 2001). Cet élément, en recrutant un complexe contenant le snRNP U2 et U2AF⁶⁵, agit comme site d'épissage 3' non utilisable et qui empêche ainsi l'inclusion de l'exon 9. Une deuxième partie de l'élément In100 peut lier la protéine hnRNP I/PTB qui agit aussi, par un mécanisme toujours inconnu, en inhibant l'inclusion de l'exon 9 (Côté et al., 2001). En plus du contrôle par les facteurs d'épissage, le promoteur utilisé pour transcrire le gène Ich-1 permettrait aussi de moduler son épissage alternatif (Logette et al., 2003). En effet, l'utilisation du promoteur le plus distal permet la formation des deux isoformes alors que le promoteur proximal favorise la formation de l'isoforme Casp-2S. Cette modulation

serait causée par l'inclusion d'exons 1 différents contenant des codons d'initiation de traduction (AUG) différents selon le promoteur utilisé.

Le gène apoptotique Bcl-x

Bcl-x est un gène apoptotique bien connu dont les deux principaux isoformes, Bcl-x_S et Bcl-x_L, ont des effets antagonistes dans l'apoptose. Ces deux isoformes sont formés par l'utilisation de deux sites d'épissage 5' de l'exon 2 (schéma 8) (Boise et al., 1993). L'utilisation du site d'épissage 5' distal permet de former l'isoforme pro-apoptotique Bcl-x_S (S pour Short) alors que l'utilisation du site d'épissage 5' proximal permet la formation de l'isoforme anti-apoptotique Bcl-x_L (L pour Long). La protéine Bcl-x_L peut se localiser à la membrane mitochondriale via son domaine trans-

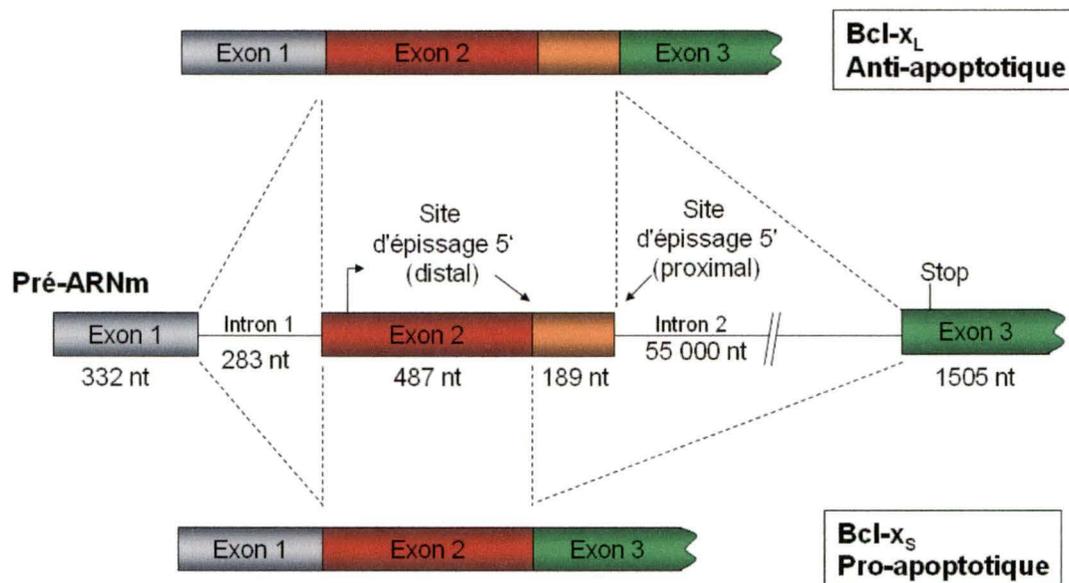


Schéma 8. Structure du pré-ARNm de Bcl-x ainsi que des isoformes Bcl-x_L et Bcl-x_S.

membranaire où elle agirait en préservant l'intégrité de la membrane mitochondriale empêchant par le fait même la sortie du cytochrome c dans le cytoplasme, un évènement qui engendre l'apoptose de manière irréversible (Shimizu et al., 2000). Bcl-x_L pourrait aussi lier la protéine Apaf-1 et inhiber ainsi l'activation des caspases pouvant être engendrée par celle-ci (Hu et al., 1998). L'hétérodimérisation de Bcl-x_L avec les protéines Bax et Bak permettrait d'inhiber leurs effets pro-apoptotiques, alors que l'interaction avec les protéines à domaine BH3 seulement inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-x_L (Cory et Adams, 2002; Cory et al., 2003; Danial et Korsmeyer, 2004). En ce qui concerne Bcl-x_S, il pourrait agir en inhibant les effets anti-apoptotiques de Bcl-x_L et de Bcl-2 en se liant à ceux-ci (Minn et al., 1996). Les autres mécanismes d'action de Bcl-x_S demeurent mal compris. Selon le type cellulaire, Bcl-x_S pourrait provoquer l'apoptose de manière dépendante des caspases et de la sortie du cytochrome c dans le cytoplasme (Braun et al., 2003; Lindenboim et al., 2000) ou au contraire, indépendamment des caspases et de la libération du cytochrome c (Fridman et al., 1999).

D'autres isoformes, moins étudiés, sont aussi produits par le gène Bcl-x (schéma 9). Un de ces isoformes, Bcl-x_β, est formé lorsque les sites d'épissage 5' de l'exon 2 ne sont pas utilisés et qu'une partie de l'intron est traduite (Gonzalez-Garcia et al., 1994; Shiraiwa et al., 1996). Cet isoforme est surtout retrouvé dans les tissus embryonnaires et post-nataux et possède une activité anti-apoptotique. Un autre isoforme, Bcl-x_γ, est constitué des deux premiers exons ainsi que d'un autre exon, utilisé uniquement dans cet isoforme, soit l'exon 4 (Yang et al., 1997). Bcl-x_γ est retrouvé chez les

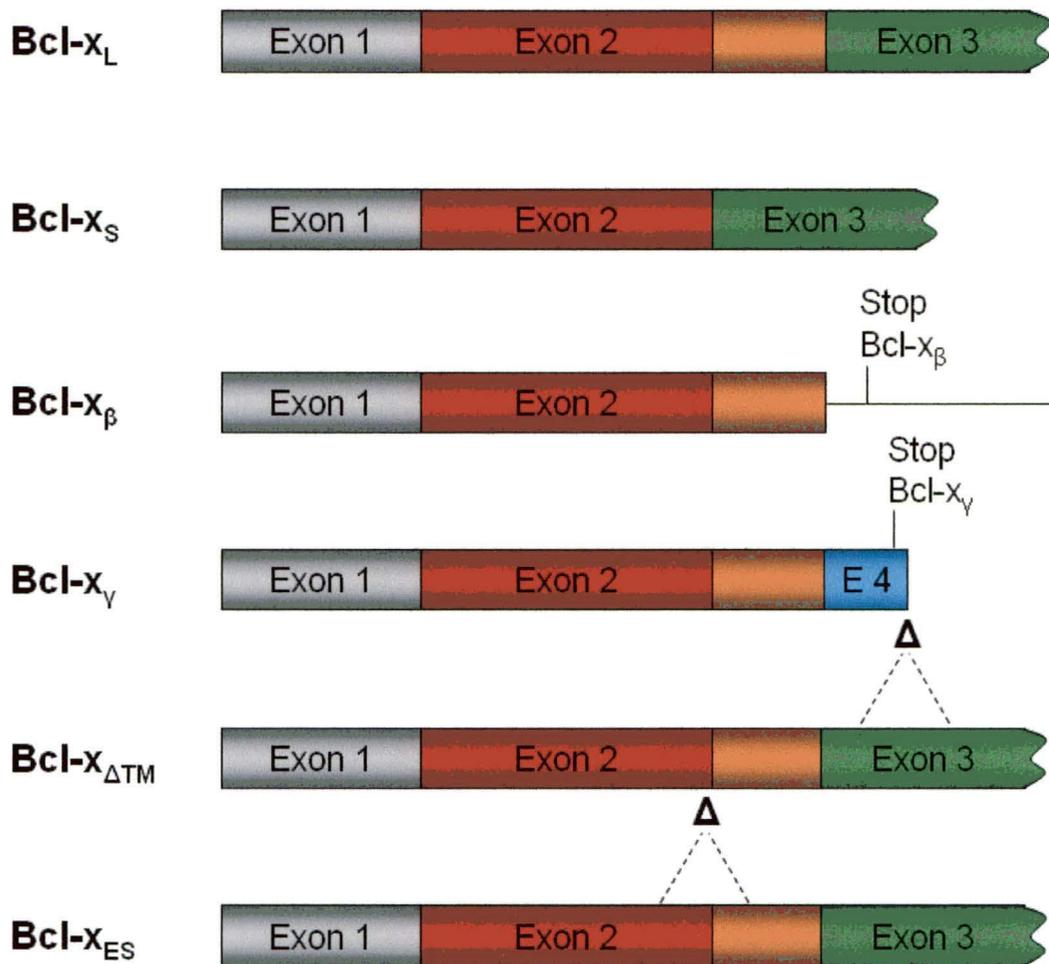


Schéma 9. Isoformes connus produits par le gène Bcl-x.

thymocytes et les cellules T matures où il agit en empêchant l'apoptose. L'isoforme Bcl-x_{ΔTM} est fort semblable à Bcl-x_L, mais sans le domaine trans-membranaire qui est supprimé par épissage alternatif. Cette protéine joue donc aussi un rôle anti-apoptotique, mais se localise dans le cytoplasme plutôt qu'aux membranes (Fang et al., 1994). Récemment, un autre isoforme, Bcl-x_{ES} (extra short), a été découvert. Cet isoforme possède une région située à l'intérieur de l'exon 2 supprimée par épissage alternatif. La protéine produite possède une activité anti-apoptotique et se retrouve

dans une grande variété de tissus humains et de lignées cellulaires cancéreuses (Schmitt et al., 2004).

La compréhension des mécanismes contrôlant l'épissage de Bcl-x est fort importante puisqu'un dérèglement dans la formation de ces isoformes peut amener certaines complications. Dans plusieurs cancers ou lignées cancéreuses, une augmentation de Bcl-x_L est observée, souvent au détriment du niveau de Bcl-x_S (Krajewska et al., 1996; Olopade et al., 1997; Reeve et al., 1996; Tu et al., 1998). Une surexpression de la protéine Bcl-x_L est aussi associée à la résistance aux drogues anticancéreuses, à une diminution de l'apoptose chez les cellules cancéreuses et à un risque accru de former des métastases (Olopade et al., 1997; Schott et al., 1995). Une surexpression de Bcl-x_L est aussi observée chez les patients souffrant de la maladie de Parkinson (Hartmann et al., 2002). Quant à Bcl-x_S, une augmentation de sa production peut engendrer l'apoptose ou sensibiliser les cellules à certains agents chimiothérapeutiques (Clarke et al., 1995; Ealovega et al., 1996; Mercatante et al., 2001; Sumantran et al., 1995; Taylor et al., 1999).

Des expériences utilisant des oligonucléotides modifiés antisens complémentaires au site d'épissage de Bcl-x_L ont montré que l'épissage de Bcl-x pouvait être modulé artificiellement afin de d'augmenter le ratio Bcl-x_S/Bcl-x_L dans des lignées cellulaires cancéreuses (Mercatante et al., 2001; Mercatante et al., 2002; Taylor et al., 1999). Ces études montrent que l'augmentation du niveau de Bcl-x_S ne provoque pas l'apoptose dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses. En effet, seules les cellules cancéreuses

de prostate PC-3 entrent en apoptose lorsque un oligo antisens contre Bcl-x_L est utilisé. L'augmentation du niveau de Bcl-x_S dans les autres lignées cellulaires testées (de carcinome de poumon A549 et de cancer du sein MCF-7) permet cependant d'augmenter la sensibilité de ces cellules aux agents causant l'apoptose, comme les radiations ultraviolettes, le cisplatine, la staurosporine ou le paclitaxel. De plus, une étude montre que l'apoptose engendrée lors du traitement avec un tel oligo antisens se fait de manière caspase-dépendante (Taylor et al., 1999).

Peu de choses sont connues sur la régulation naturelle de l'épissage de Bcl-x. Un lien entre le promoteur utilisé et l'isoforme produit pourrait cependant exister. En effet, Bcl-x peut être transcrit par cinq promoteurs différents (P1 à P5) dont certains sont utilisés dans une grande variété de tissus alors que d'autres seraient utilisés dans certains tissus spécifiques (Grillot et al., 1997; Pecci et al., 2001). L'utilisation de l'un ou l'autre de ces promoteurs permet la formation de 5' UTR (5' untranslated region) différents qui pourraient agir sur le choix de sites d'épissage. Une étude suggère que l'utilisation du promoteur le plus proximal P1 permettrait la formation presque exclusive de Bcl-x_L, que le promoteur P3 engendrerait la formation des deux isoformes alors que le promoteur P4 permettrait la formation d'une plus grande quantité de Bcl-x_S (Pecci et al., 2001).

Certaines drogues sont connues pour provoquer directement ou indirectement un changement dans l'épissage de Bcl-x. Il fut montré que des drogues de la famille des amphétamines provoquent une augmentation du niveau de Bcl-x_S dans les cellules

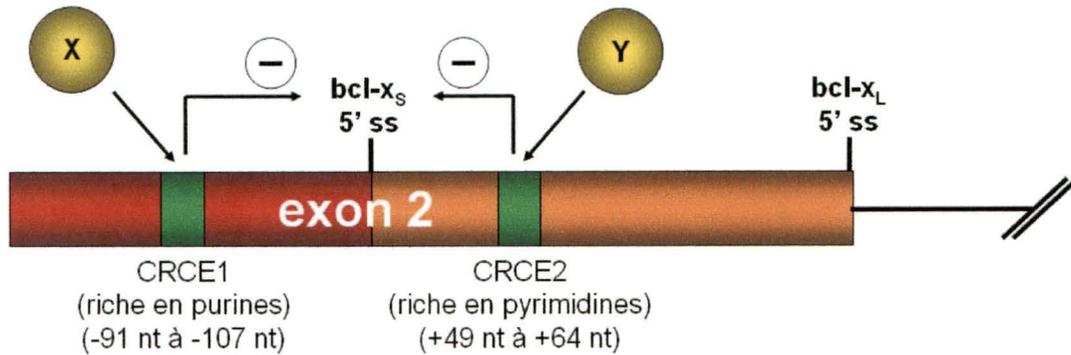


Schéma 10. Représentation du contrôle de l'épissage de Bcl-x via les éléments CRCE1 et CRCE2 sensibles à la céramide. Les positions de éléments CRCE1 et CRCE2 sont par rapport au site d'épissage 5' de Bcl- x_S .

neuronaux au détriment de l'isoforme Bcl- x_L (Stumm et al., 1999). De plus, des agents causant l'apoptose comme la staurosporine et la céramide provoquent dans certains types cellulaires, une diminution du niveau de Bcl- x_L et dans certains cas, une augmentation de Bcl- x_S (Chalfant et al., 2002; Giuliano et al., 2004). Une étude effectuée sur des cellules A549 montre que l'accroissement intracellulaire de céramide dans ces cellules module l'épissage de Bcl-x en augmentant la formation de l'isoforme pro-apoptotique Bcl- x_S via deux éléments *cis* (Chalfant et al., 2002). La céramide est un composé qui engendre l'apoptose en activant les protéines phosphatases PP1 et PP2A déjà connues pour avoir entre autres les protéines SR comme substrats (Chalfant et al., 2001; Mermoud et al., 1994). Deux éléments exoniques sont responsables de l'action de la céramide sur l'épissage de Bcl-x : une séquence riche en purines (CRCE1) ainsi qu'une séquence riche en pyrimidines (CRCE2) respectivement retrouvées en amont et en aval du site d'épissage 5' de Bcl- x_S (Massiello et al., 2004) (schéma 10). Ces deux éléments agissent en réprimant l'utilisation du site d'épissage de *bcl-x_S* et sont liés par diverses protéines dont

l'identité est inconnue. La déphosphorylation des protéines pouvant lier ces séquences pourrait provoquer une perte d'activité de ces facteurs, ce qui permettrait d'expliquer l'augmentation de formation de l'isoforme pro-apoptotique lorsque la concentration intracellulaire de céramide s'élève.

Comprendre la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x apporte non seulement une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'épissage, mais aussi une meilleure compréhension de l'apoptose et de maladies telles le cancer. Comme peu de choses sont connues sur la modulation de l'épissage alternatif de ce gène, nous avons trouvé pertinent de chercher à comprendre les mécanismes permettant de réguler l'épissage de Bcl-x. L'objectif de mon projet fut donc de chercher des éléments régulateurs en *cis* ainsi que des facteurs *trans* responsables de la modulation de l'épissage de Bcl-x.

Matériel et méthodes

Constructions plasmidiques

Le mini-gène initial de type sauvage fut préalablement créé par d'autres membres du laboratoire (Annie Leroux, Aline Simoneau et Stephen Hutchison) à partir de séquences du gène Bcl-x humain provenant de Bacpac Resources. La portion 5' du mini-gène fut amplifiée par PCR à partir du clone BAC RPC1-11-243J16 (Bacpac Resources) et en utilisant les amorces Human1 et Human2. Le fragment de PCR obtenu fut inséré dans le vecteur pBluescript K+, préalablement coupé avec l'enzyme HincII, pour ainsi générer le plasmide pSB5. La portion 3' du mini-gène de type sauvage provient du clone PAC RPC1-5-857M17 (Bacpac Resources) et fut amplifiée par PCR en utilisant les amorces Bclx-1 et Bclx-2. Ce fragment de PCR fut cloné dans le plasmide pBS5 dont la linéarisation fut effectuée avec l'enzyme EcoRV pour former ainsi le plasmide pS2.13 contenant le mini-gène de type sauvage.

Le plasmide pS2.13- Δ i1 fut produit en effectuant un PCR sur pS2.13 en utilisant les amorces X-*nco*I et XL+hincII. Ce fragment de PCR fut digéré avec *Nco*I et HincII et substitué pour le fragment *Nco*I – HincII de type sauvage retrouvé dans pS2.13. pS2.13- Δ i2 provient de pS2.13 digéré par BstEII et BseRI, traité à la Klenow (New England BioLabs) et reliqué sur lui-même. pS2.13- Δ i3 fut construit en supprimant le fragment BseRI – EcoNI de pS2.13. Ce dernier fut coupé, traité à la Klenow et reliqué

sur lui-même. Le plasmide pS2.13- Δ i4 provient de pS2.13 digéré avec les enzymes EcoNI et ClaI, traité à la Klenow et reliqué sur lui-même.

Le plasmide pS2.13 Δ B2 fut produit en effectuant un PCR sur pS2.13 en utilisant les amorces X-ncoI et XS+accI et dont le produit fut par la suite digéré avec NcoI et AccI. Ce fragment fut utilisé afin de substituer le fragment NcoI – AccI de type sauvage du plasmide pS2.13. Le plasmide pS2.13 Δ B3 fut créé en substituant le fragment AccI – HincII de type sauvage par un produit de PCR fait avec les amorces XL+accI et X-hincII sur pS2.13 et digéré par les enzymes AccI et HincII.

Pour la construction du plasmide pS2.13 Δ B2G, un fragment de PCR effectué sur pS2.13 avec les amorces NDsc3 et Be-hincII fut produit afin de substituer le fragment AccI – HincII du plasmide pS2.13 Δ B2 traité à la Klenow après digestion par les enzymes correspondantes. Le plasmide pS2.13 Δ B2.2 fut construit en substituant le fragment AccI – ncoI de pS2.13 par un fragment de PCR créé à partir de pS2.13 avec les amorces X-ncoI et Dsc2 et digéré avec les enzymes NcoI et AccI. Une stratégie identique fut utilisée pour la fabrication de pS2.13 Δ 2.1. Le fragment AccI – NcoI de pS2.13 fut substitué par un fragment de PCR fait avec les amorces X-ncoI et Dsc1 provenant de pS2.13 et digéré avec NcoI et AccI.

Les plasmides pS2.13 Δ B2 λ ⁺ et pS2.13 Δ B2 λ ⁻ ont été construits en insérant dans les deux orientations une séquence de 73 pb provenant du génome du bactériophage lambda obtenue par une digestion avec l'enzyme AvaII suivi d'un traitement à la

Klenow (région correspondant à la position 16611 à 16683 du génome lambda). Le fragment fut inséré dans le plasmide pS2.13ΔB2 digéré par l'enzyme AccI. La construction pS2.13ΔB3s consiste en l'insertion d'un fragment de 65 pb, provenant du vecteur pBluescript K+ digéré HinfI et traité à la Klenow, dans le plasmide pS2.13ΔB3 digéré avec AccI et traité à la Klenow.

Le plasmide pS-Mut1 fut créé par mutagenèse par « overlap ». Deux premiers produits de PCR furent synthétisés à partir du plasmide pS2.13 et avec des amorces contenant les mutations devant être insérées. Le premier produit fut amplifié avec les amorces X-GGC et X-hincII et le second avec les amorces X-ncoI et X-GGCr. Ces deux produits de PCR ont par la suite été utilisés comme substrats pour un second PCR fait avec les amorces X-ncoI et X-hincII. Ce dernier produit obtenu fut par la suite coupé avec les enzymes NcoI et HincII et substitué au fragment NcoI – HincII de type sauvage du plasmide S2.13. pS-Mut2 fut construit avec la même technique que celle utilisée pour produire le plasmide pS-Mut1. Les deux premiers fragments de PCR furent produits avec les amorces X-GCC et X-hincII ainsi que X-ncoI et X-GGCr et servirent de substrats pour le second PCR fait avec les amorces X-ncoI et X-hincII. Ce dernier fragment contenant les mutations fut digéré avec les enzymes NcoI et HincII pour, par la suite, substituer le fragment de type sauvage NcoI – HincII du plasmide S2.13.

Transcription in vitro

Le substrat utilisé pour la transcription *in vitro* est un fragment de PCR produit en utilisant le plasmide contenant le mini-gène désiré, les amorces bT3 et Bclx-2B et l'enzyme PfuTurbo (Stratagene), selon les instructions du fabricant. Le produit de PCR d'intérêt est isolé sur gel d'agarose et purifié en utilisant le QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen) suivant les instructions du fabricant. Le fragment purifié fut élué dans un volume final de 50 µl de H₂O. La réaction de transcription est faite dans un volume total de 100 µl en utilisant 20 µl de tampon SP6 5X (1 M Tris-HCl pH 7.5, 1 M MgCl₂, 1M spermidine et 1 M DTT), 0,5 mM des ribonucléotides A, C et U, 0,1 mM du ribonucléotide G, 8 µl de coiffe m⁷G(5')ppp(5')G (Amersham Biosciences), 80 unités de RNAGuard (40 unités/µl) (Amersham Biosciences), 80 unités d'ARN polymérase T3 (40 unités/µl) (USB), 0,5 µl de [α -³²P]UTP (800 Ci/mmol) (PerkinElmer Life Sciences) et les 30 µl de produits de PCR purifiés. Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 1 heure et chargés sur un gel d'acrylamide dénaturant (8 M urée). Les ARNs sont par la suite purifiés comme indiqué (Chabot, 1994) et resuspendus dans l'eau à une concentration finale de 2 fmoles/µl.

Épissage in vitro

Deux fmoles de transcrits sont incubés dans un extrait nucléaire de cellules HeLa (Dignam et al., 1983) à 30 °C pendant 2 heures dans les conditions décrites précédemment (Krainer et al., 1984).

Amplification des produits d'épissage par RT-PCR

L'équivalent de 10 amoles d'ARN radiomarqué est utilisé pour amplification par RT-PCR. La réaction de RT est faite en utilisant l'Omniscript (Qiagen) et l'amorce bclx-2B pendant 1 heure à 37 °C, selon les instructions du manufacturier. 2 µl de la réaction de RT sont utilisés pour être amplifiés par PCR qui est fait dans 25 µl total en utilisant 2,5 µl de tampon de PCR 10X (1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl pH 7,0), 80 µM de dNTPs, 1 unité de Taq polymérase, 0,1 µl de [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) (PerkinElmer Life Sciences) et 300 nM de chaque amorce, Bclx-2 et Bclx-3. Le PCR est effectué avec les paramètres suivants : dénaturation de 3 minutes à 95 °C, 35 cycles d'amplification (15 secondes à 93 °C, 30 secondes à 60 °C et 30 secondes à 72 °C) et une extension finale de 3 minutes à 72 °C.

Production de protéines recombinantes

Les ADNc codant pour les protéines his-hnRNP F et his-hnRNP H contenus dans un vecteur pEt15b (fournis par Dr Doug Black, University of California, Los Angeles) furent coupés avec les enzymes BamHI – XbaI et insérés dans un vecteur pVL1392 afin de pouvoir les exprimer en cellules d'insectes. Les protéines hnRNP F et hnRNP H recombinantes sont produites dans le laboratoire par Jean-François Fisette et Johanne Toutant en utilisant un système d'expression par baculovirus (BD Biosciences), selon les instructions du manufacturier. La purification est faite par chromatographie d'affinité sur une colonne de Ni²⁺ (Ni-NTA Agarose, Qiagen). Les cellules d'insectes sont centrifugées et lavées avec une solution de 30 mM tris-HCl

(pH 8,0), 0,5 mM NaCl et 10% glycérol. Les cellules sont par la suite lysées par sonication dans le même tampon et le lysat est chargé sur colonne de nickel. Cette colonne est lavée deux fois avec le même tampon contenant en plus 10 mM d'imidazole et une troisième fois avec un tampon composé de 50 mM tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂ et 5 mM ATP. Les protéines sont éluées avec une solution 30 mM tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM NaCl et 500 mM imidazole et dialysées contre du Tampon D (60 mM HEPES (pH 7,9), 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT et 20% glycérol). La concentration des protéines est évaluée par la technique de Bradford en utilisant le colorant « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad) utilisé selon les indications de la compagnie.

Le plasmide pQE80LA1-WT contenant l'ADNc codant pour his-hnRNP-A1 est transformé dans *Escherichia coli* BL21. La production de his-hnRNP A1 est induite pendant 1 heure à 30 °C en ajoutant 0,05 mM d'IPTG et 0,5 mM de PMSF à une culture de 500 ml. Les bactéries sont par la suite centrifugées, lavées avec 20 ml de milieu LB et resuspendues dans un tampon de dilution (1 M NaCl, 30 mM tris-HCl (pH 8,0), 1 mM PMSF) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases à une concentration 1X (pour 1 ml de 1000X : 156 mg benzamidine, 1 mg aprotinin, 1 mg pepstatin, 1 mg leupeptin et 1 mg antipain dans du DMSO). Les bactéries sont lysées par sonication, le lysat est filtré sur filtre 0,22 µm et les protéines sont purifiées par FPLC AKTA Explorer (Amersham Biosciences) sur une colonne de nickel HisTrap 1 ml (Amersham Biosciences). Une dialyse contre du tampon D suit la purification de la protéine et la concentration finale des protéines éluées est évaluée par la technique de

Bradford en utilisant le colorant « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad), selon les indications de la compagnie.

Gel de protéines

Du colorant de Laemmli 2X (10% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol, 2,3% SDS, 62,5 mM tris-HCl [pH 6,8] et 0,1 % bleu de bromophénol) est tout d'abord ajouté à la quantité de protéines ou d'extrait nucléaire désiré. Les échantillons sont par la suite chargés sur un gel de polyacrylamide 10% (29:1, acrylamide:bis-acrylamide) / SDS. Après migration, les protéines peuvent être révélées en colorant le gel au bleu de Coomassie. Pour ce faire, le gel est trempé pendant 20 minutes dans le bleu de Coomassie (0,1% Coomassie Brilliant R Blue, 45% méthanol et 10% acide acétique) et par la suite lavé à multiples reprises dans une solution décolorante (10% méthanol et 10% acide acétique).

Immunobuvardage de type Western

Les protéines sont préalablement migrées sur gel de polyacrylamide / SDS selon les instructions précédentes. La migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham Biosciences) dans un tampon de transfert (pour 1 litre total, 3 g de tris-HCl, 14 g de glycine, 250 ml de méthanol et le volume est complété avec de l'eau) à 100 V pendant 1 heure. Une fois le transfert complété, la membrane est bloquée pendant au moins 1 heure dans une solution de TBST-5% lait (10 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5% de lait en poudre

et pH ajusté à 7,6 avec HCl). La membrane est par la suite mise en présence de l'anticorps primaire anti-hnRNP F (fourni par le Dr Doug Black, University of California, Los Angeles) dilué 1:2000 ou anti-His (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1:500 dans du TBST-5% lait et ce, pendant une durée de 1 heure. La membrane est par la suite lavée au TBST (10 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20 et pH ajusté à 7,6 avec HCl) et incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à une peroxydase de raifort (Amersham Biosciences) dilué 1:5000 dans du TBST. La membrane est lavée au TBST une seconde fois et la révélation est faite aux ECL (Amersham Biosciences) en suivant les instructions du manufacturier.

Marquage des oligos

Les oligos d'ARN ou d'ADN sont radiomarqués à l'extrémité 5'. La réaction est faite dans un volume de 20 µl en utilisant 300 pmoles d'oligonucléotides d'ARN ou d'ADN, 2 µl de tampon T4 PNK 10 X (New England Biolabs), 1 µl de T4 polynucléotide kinase (10 unités/µl) (New England Biolabs) et 5 µl de [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) (PerkinElmer Life Sciences). Les échantillons sont incubés pendant 45 min à 37 °C et le volume est par la suite complété à 25 µl avec de l'eau. Les oligonucléotides marqués sont purifiés sur colonne G-25 (Amersham Biosciences) selon les instructions du fabricant.

Gel de retardement

5000 cpm (environ 75 nM) des oligos d'ARN ou d'ADN radiomarqués sont incubés sur glace pendant 5 minutes dans 3,5 µl de tampon D, 2,25 µl de mélange d'épissage (1,4 mM rATP, 9 mM MgCl₂, 50 mM créatine phosphate, 7% polyvinylalcool, 5,5 mM DTT, 10 U RNAguard (Amersham Biosciences)) et en présence ou en absence de 2,5 µM de protéines recombinantes. 1,75 µl de colorant contenant 40 µg d'héparine est ajouté après les 5 minutes d'incubation sur glace et les échantillons sont par la suite chargés et migrés sur gel d'acrylamide 5% (29:1, acrylamide:bis-acrylamide) dans un tampon tris-glycine (50 mM tris-HCl et 50 mM de glycine).

Séquence des oligonucléotides d'ADN

Human1	CTCAGAGCAACCGGGAGCTGG
Human2	CACTGGGCAGCTGGCAATTCT
Bclx-1	ATTATCACCAATGGAGGGTCA
Bclx-2	TCATTTCCGACTGAAGAGTGA
X-ncol	GAGGTGATCCCCATGGCAGCAG
XL+hincII	ATATATGTAACTGGTTCTTACCCAGCCG
XS+accI	ATATATGTCTACCATTCACTACC
XL+accI	ATATATGTAGACCGGCGGCTGGGTA
X-hincII	TCCAAGGAGTTAACCTCTTG
NDsc3	CGCATTGTGGCCTTT
Be-hincII	AACCTCTTGTGGTCAAAT

Dsc2	CACACAGTCTACCCGAAGGAGAA
Dsc1	CTCTCTGTCTACACCCCAGTTTAC
X-GGC	GGGATGGGGTAAACTGCCGTCGCATTGTGGCCT
X-GGCr	AGGCCACAATGCGACGGCAGTTTACCCCATCCC
X-GCC	GGGATGCCGTAAACTGCCGTCGCATTGTGGCCT
X-GCCr	AGGCCACAATGCGACGGCAGTTTACGGCATCCC
bT3	GACCATGATTACGCCAAGCGS
Bclx-2B	CGCTCTAGAACTAGTGGATC
Bclx-3	ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG

Résultats

A. Le premier 1,2 kb de l'intron 2 de Bcl-x ne semble pas contenir d'éléments régulateurs de l'épissage de Bcl-x

Afin d'étudier les mécanismes d'épissage de Bcl-x *in vitro*, nous avons construit un mini-gène provenant de la séquence du gène Bcl-x humain. Un plasmide contenant ce mini-gène, nommé pS2.13, contient les 331 dernières pb de l'exon 2 (comprenant ainsi les deux sites d'épissage 5' de l'exon 2), les 1192 premières pb de l'intron 2, les 182 dernières pb de l'intron 2 et finalement le site d'épissage 3' suivi des 137 premières pb de l'exon 3 (Fig. 1A). Un transcrit S2.13 dérivé du mini-gène, produit majoritairement une partie de l'isoforme Bcl-x_L après épissage *in vitro* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa (Fig. 1B). Ce profil d'épissage obtenu avec le transcrit S2.13 est semblable à celui du Bcl-x endogène observé dans les cellules HeLa (Fig. 1C). Les niveaux de Bcl-x_L et de Bcl-x_S obtenus avec le transcrit S2.13 peuvent varier légèrement d'une expérience à l'autre en fonction de l'extrait nucléaire utilisé et des conditions. Cependant, tous les transcrits mutés dérivés de S2.13 et testés dans l'épissage sont toujours comparés au transcrit S2.13 épissé au cours de la même expérience effectuée simultanément et dans les mêmes conditions.

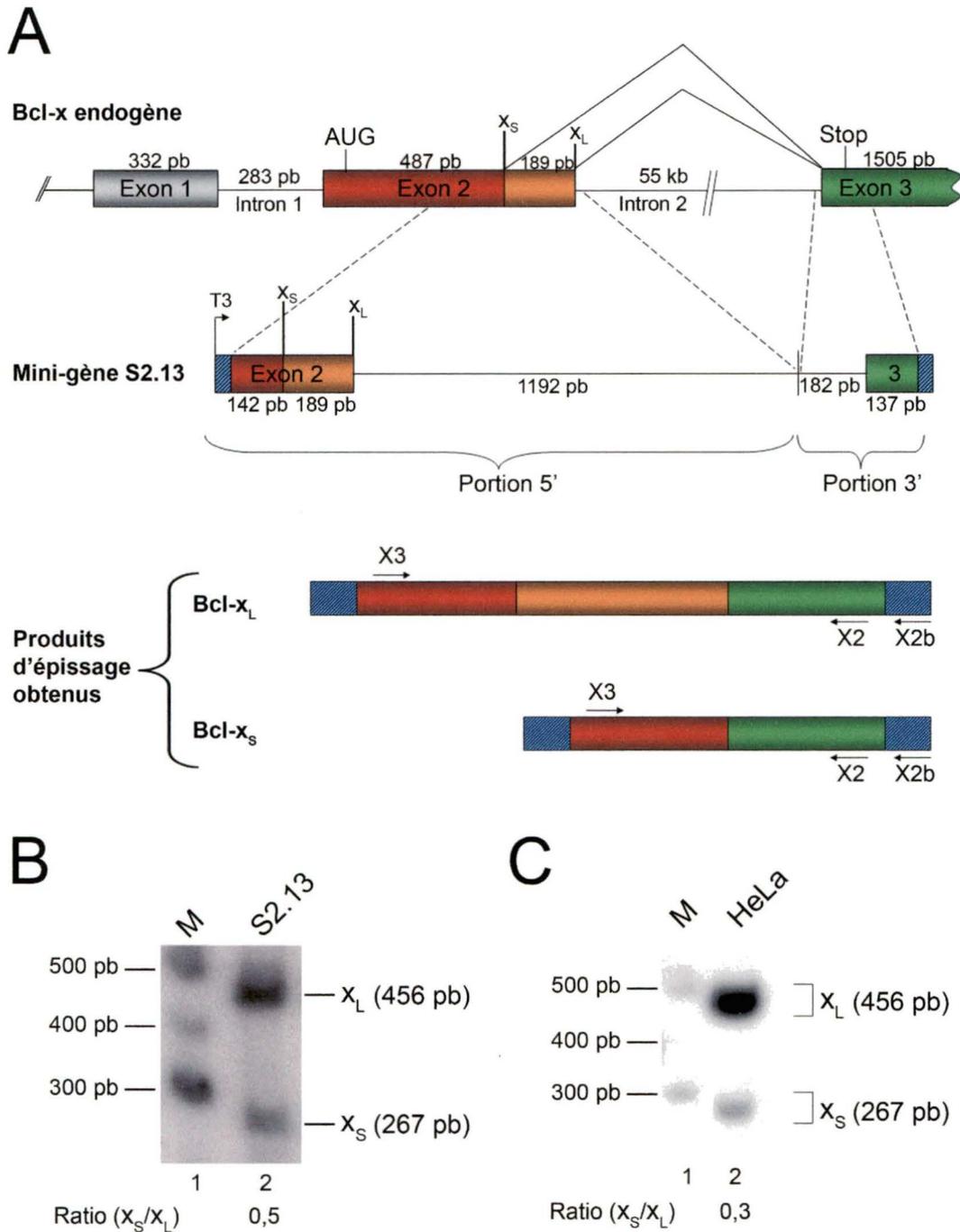


Figure 1. Le profil d'épissage *in vitro* du transcrite S2.13 est semblable à celui de *bcl-x* endogène des cellules HeLa. A, Représentation du mini-gène initial utilisé comme contrôle dans les expériences d'épissage *in vitro*. Ce mini-gène fut construit en deux parties : une portion 5' comprenant 331 pb de l'exon 2 avec les deux sites d'épissage 5' et 1192 pb du début de l'intron 2 ainsi qu'une portion 3' contenant le site d'épissage 3' de l'exon 3, une partie de la fin de l'intron 2 et le début de l'exon 3.

Les produits obtenus après épissage du transcrit S2.13. L'emplacement des amorces pour le RT (X2b) et pour le PCR (X3 et X2) est indiqué. **B**, Amplification par RT-PCR des produits d'épissage *in vitro* du transcrit S2.13. L'épissage de S2.13 s'est fait pendant 2 heures à 30 °C dans un extrait nucléaire de cellules HeLa. Les produits furent migrés sur gel d'acrylamide et quantifiés par InstantImager. **C**, Amplification par RT-PCR des produits d'épissage du bcl-x endogène à partir d'une extraction d'ARNs totaux de cellules HeLa. Les produits de PCR furent migrés sur gel d'acrylamide et quantifiés sur InstantImager.

Nous avons débuté la recherche d'éléments régulateurs de l'épissage de Bcl-x en vérifiant l'activité de régions conservées de l'intron 2. La présence de séquences conservées dans des régions introniques, habituellement très peu conservées au cours de l'évolution, est souvent une indication que ces régions jouent un rôle important dans l'épissage alternatif (Chabot et al., 1997). En vérifiant l'alignement des introns 2 des séquences génomiques de Bcl-x provenant de l'humain, de la souris et du rat, nous avons pu remarquer une très forte homologie de séquences pour les 1000 premiers nucléotides de cet intron (soit environ 70 % de conservation entre les trois espèces). Un tel niveau de conservation n'a pu nous permettre d'identifier des éléments précis susceptibles de réguler l'épissage de Bcl-x. Ce résultat ne révoque cependant pas la possibilité que des éléments régulateurs pourraient se trouver dans l'intron 2 de Bcl-x. Ce haut niveau de conservation peut être expliqué par l'existence de l'isoforme Bcl-x_β dont une partie de l'intron 2 est traduite.

Étant dans l'impossibilité d'attribuer l'existence d'éléments régulateurs dans l'intron 2 par inspection visuelle, nous avons décidé d'effectuer différentes délétions dans l'intron 2 du mini-gène S2.13. Pour ce faire, nous avons produit, à partir du transcrit S2.13, quatre nouveaux transcrits possédant chacun une délétion d'une partie

différente de l'intron 2. Un premier transcrit (S2.13- Δ i1) possède une délétion couvrant la région +11 à +153 par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_L, totalisant ainsi 143 nt (Fig. 2A). Les nucléotides +218 à +504 (287 nt) furent enlevés afin de former un deuxième transcrit (S2.13- Δ i2). Un troisième transcrit (S2.13- Δ i3) fut créé

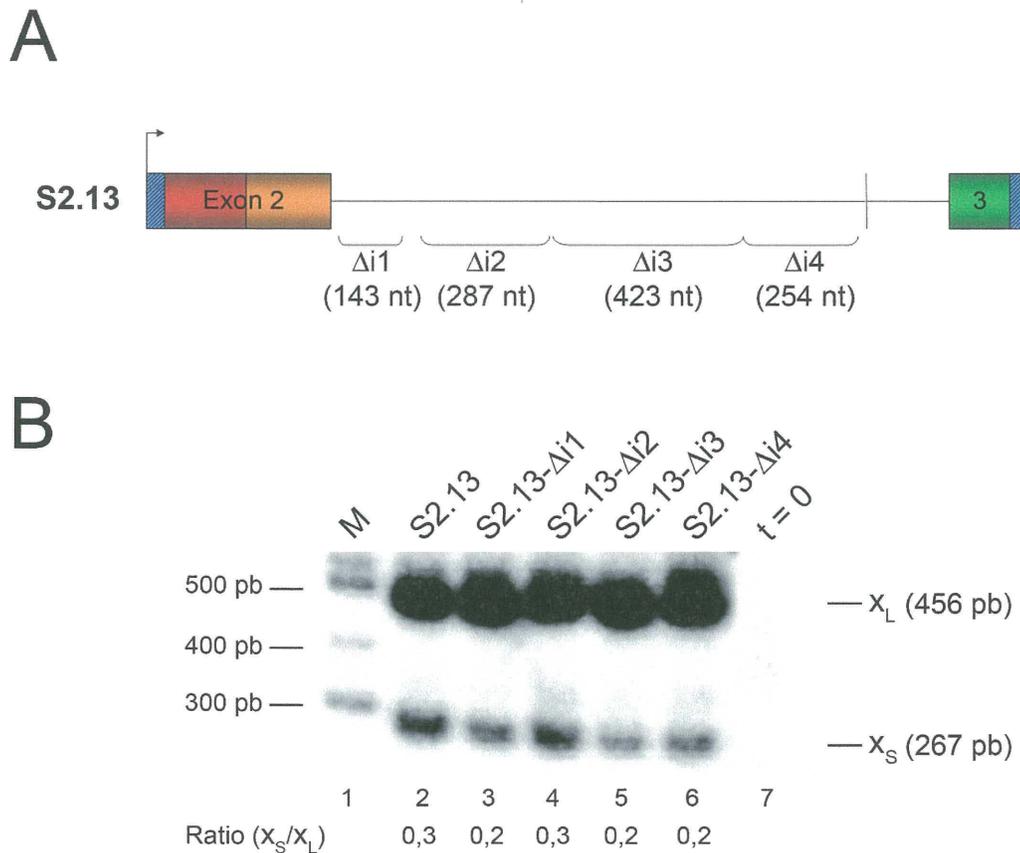


Figure 2. La délétion de différentes parties de l'intron 2 du transcrit S2.13 ne cause aucune altération majeure dans le choix des sites d'épissage 5' de l'exon 2 de bcl-x. **A**, Schéma représentant la position et les tailles des différentes délétions introniques effectuées sur le transcrit S2.13. **B**, Incubation du transcrit S2.13 (piste 2) et des quatre transcrits possédant une délétion intronique (pistes 3 à 6) dans un extrait nucléaire de cellules HeLa dans des conditions d'épissage pendant 2 heures à 30 °C. Le contrôle t = 0 (piste 7) fut effectué avec le transcrit S2.13 incubé 2 heures sur glace dans les mêmes conditions que les transcrits épissés pendant 2 heures à 30 °C. Les ARNs furent amplifiés par RT-PCR, migrés sur gel d'acrylamide et quantifiés par InstantImager.

en enlevant les nucléotides +504 à 926 (423 nt) et un dernier transcrit (S2.13- Δ i4) porte une délétion des nucléotides +927 à +1181 (254 nt). Avec ces quatre nouveaux transcrits, la grande majorité des 1192 premiers nucléotides retrouvés dans le transcrit S2.13 sont couverts par une des délétions. Afin de vérifier si le choix des sites d'épissage 5' de l'exon 2 de Bcl-x pourrait être modulé par un élément se trouvant dans l'une ou l'autre de ces délétions introniques, nous avons fait l'épissage *in vitro* de ces quatre nouveaux transcrits ainsi que de S2.13, correspondant au transcrit de type sauvage. Les produits d'épissage furent par la suite amplifiés par RT-PCR, chargés un sur gel d'acrylamide et exposés sur InstantImager. De plus, afin de s'assurer qu'aucun produit de PCR non spécifique ne puisse co-migrer avec les produits correspondant aux isoformes Bcl-x_L et Bcl-x_S, un contrôle non-épissé (nommé t = 0) fut aussi amplifié. Ce contrôle consiste à mettre le transcrit S2.13 dans les mêmes conditions qu'un épissage conventionnel, à l'exception de l'incubation de l'échantillon qui est faite sur glace et non à 30 °C.

Le résultat d'épissage obtenu avec chacun des transcrits comportant une délétion intronique fut par la suite vérifié et comparé avec les niveaux de Bcl-x_L et de Bcl-x_S obtenus avec le transcrit S2.13 (Fig. 2B, comparer les pistes 3 à 6 avec la piste 2). Ces résultats suggèrent qu'aucun élément ne régule de manière significative le choix des sites d'épissage 5' de l'exon 2 de Bcl-x en épissage *in vitro*. De plus, aucun produit n'est retrouvé dans le contrôle t = 0 (Fig. 2B piste 7), suggérant que les produits observés dans les pistes précédentes correspondent bien aux produits Bcl-x_L et Bcl-x_S attendus et non pas à des produits de PCR non spécifiques.

B. Deux régions modulent le choix des sites d'épissage 5' de Bcl-x

Nous avons décidé de poursuivre la recherche d'éléments de contrôle en nous tournant vers l'exon 2 de Bcl-x. L'exon 2 fut choisi en faveur de l'exon 3 car les éléments régulateurs d'épissage se retrouvent le plus souvent à proximité des sites d'épissage contrôlés. En effet, comme l'exon 3 se situe naturellement à plus de 55 000 nt des sites d'épissage de l'exon 2, il est peu probable d'y retrouver des éléments régulateurs.

Comme les régions exoniques sont codantes et fortement conservées, aucun élément ne peut y être facilement identifié par homologie de séquences. Nous avons donc effectué des délétions dans l'exon 2. Deux nouveaux transcrits furent produits possédant chacun une délétion différente située entre les deux sites d'épissage 5' de l'exon 2 du transcrit S2.13. Le premier transcrit (S2.13ΔB2) possède une délétion d'une région que nous avons nommé B2, située en aval du site d'épissage 5' de Bcl-x_S et couvrant une longueur de 77 nt (de +11 à +87 nt par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_S) (Fig. 3A). Le deuxième transcrit (S2.13ΔB3) possède une délétion de la région en amont du site d'épissage de Bcl-x_L d'une longueur de 86 nt (de -10 nt à -95 nt par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_L), une région que nous avons nommé B3.

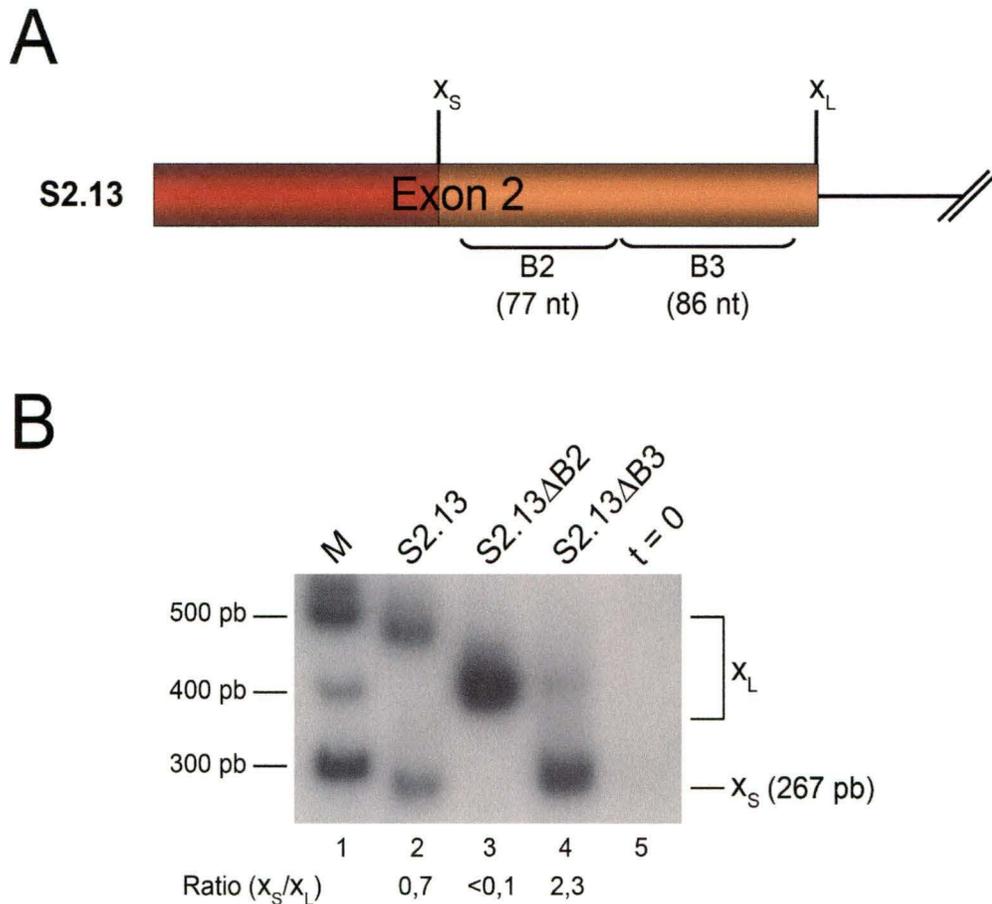


Figure 3. Deux délétions exoniques différentes permettent de modifier le profil d'épissage *in vitro* du transcrit S2.13. **A**, Représentation schématique identifiant la localisation et la taille des deux régions exoniques supprimées du transcrit initial S2.13. **B**, Les transcrits S2.13 (piste 2), S2.13ΔB2 (piste 3) et S2.13ΔB3 (piste 4) furent incubés dans des conditions d'épissage pendant 2 heures à 30 °C. Un contrôle t = 0 (piste 5) fut ajouté, consistant à l'incubation de S2.13 dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures sur glace. Les ARNs furent amplifiés par RT-PCR, migrés sur gel d'acrylamide et quantifiés par InstantImager.

Ces deux nouveaux transcrits ainsi que S2.13 furent épissés *in vitro* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa afin de vérifier si ces délétions contenaient d'éventuels éléments régulateurs des sites d'épissage de Bcl-x. Les produits d'épissage ont par la suite été amplifiés par RT-PCR, migrés sur un gel de polyacrylamide et exposés sur

film. Le profil d'épissage obtenu pour chacun des transcrits possédant une délétion fut comparé à celui obtenu avec S2.13. La comparaison entre les transcrits S2.13 Δ B2 et S2.13 montre que lorsque la région B2 est supprimée, la formation de l'isoforme Bcl-x_L est favorisée à un point tel que seul cet isoforme est visible après épissage de S2.13 Δ B2, contrairement à S2.13 qui produit toujours un certain niveau de Bcl-x_S (Fig. 3B, comparer la piste 3 avec la piste 2). À l'inverse, une comparaison entre l'épissage du transcrit S2.13 Δ B3 et S2.13 montre que lorsque la région B3 est supprimée, l'isoforme Bcl-x_S est majoritairement produit après épissage comparativement à une majorité de Bcl-x_L pour le transcrit S2.13 (Fig. 3B, comparer la piste 4 avec la piste 2). Ces résultats suggèrent que la région B2, située en aval du site d'épissage 5' de Bcl-x_S, joue un rôle essentiel afin de permettre la production de l'isoforme Bcl-x_S dans des cellules HeLa. Quant à la région B3 qui se trouve en amont du site d'épissage 5' de Bcl-x_L, elle aurait comme fonction de favoriser l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_L. De plus, comme ces effets ont été observés dans une réaction d'épissage *in vitro*, nous pouvons affirmer qu'ils sont bel et bien causés par une modulation de l'épissage et non pas par un changement dans la stabilité des ARNs utilisés.

Le site d'épissage 5' de Bcl-x_S est toujours fonctionnel malgré la délétion de la région B2.

Comme seul l'isoforme Bcl-x_L est produit par l'épissage du transcrit S2.13 Δ B2 et que la délétion de la région B2 se situe tout près du site d'épissage de Bcl-x_S (11 nt), nous

avons voulu vérifier si ce site d'épissage était toujours fonctionnel. Pour y parvenir, nous avons fait l'épissage des transcrits S2.13 et S2.13ΔB2 dans un extrait nucléaire de cellules HeLa en présence de concentrations croissantes d'un oligo d'ARN antisens complémentaire au site d'épissage 5' de Bcl-x_L (X5 : UUCUUACCCAGCCGCGUUC). Après épissage, les produits furent amplifiés par RT-PCR, chargés sur un gel d'acrylamide et exposés sur film. Étant donné que l'oligo X5 permet de cacher le site d'épissage 5' de Bcl-x_L et qu'il empêche ainsi la reconnaissance de ce site par le snRNP U1, la formation de l'isoforme Bcl-x_S devrait donc être favorisée par la présence de cet oligonucléotide (Villemaire et al., 2003). Les niveaux de Bcl-x_L et de Bcl-x_S obtenus pour chaque concentration d'oligo utilisée (8, 80 et 800 nM) furent comparés pour chacun des transcrits. Tout d'abord, lorsque le transcrit S2.13 est utilisé (Fig. 4, pistes 2 à 5), l'augmentation du niveau de Bcl-x_S est perceptible dès l'ajout de 8 nM de l'oligo X5 et la formation presque exclusive de Bcl-x_S est observée en présence de 80 nM de cet oligo. Pour ce qui est du transcrit S2.13ΔB2, l'ajout d'oligos antisens à la réaction d'épissage permet de voir apparaître l'isoforme Bcl-x_S (Fig. 4, pistes 6 à 9). Cependant, une plus grande quantité d'oligos semble nécessaire pour obtenir les mêmes effets qu'avec le transcrit S2.13. En effet, une concentration de 800 nM d'oligos est nécessaire pour obtenir la formation unique de l'isoforme Bcl-x_S avec le transcrit S2.13ΔB2 alors qu'une quantité dix fois moindre d'oligos est nécessaire avec S2.13. Ces résultats montrent bien que malgré la délétion de la région B2, le site d'épissage 5' de Bcl-x_S est toujours fonctionnel. Ce dernier semble par contre plus difficilement utilisable.

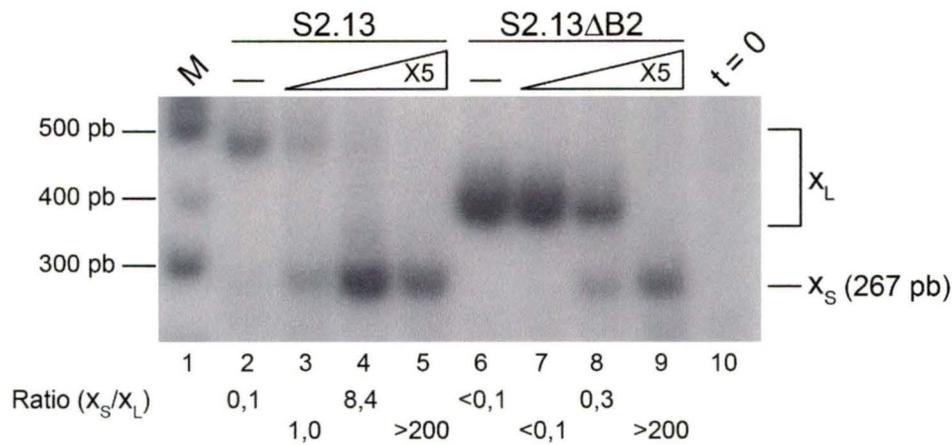


Figure 4. Le site d'épissage 5' de bcl-x_S est toujours utilisable malgré l'absence de la région B2. Les transcrits S2.13 (pistes 2 à 5) et S2.13ΔB2 (pistes 6 à 9) furent incubés pendant 2 heures à 30 °C dans un extrait nucléaire de cellules HeLa en absence ou en présence de concentrations croissantes (8, 80 et 800 nM) d'un oligonucléotide antisens complémentaire au site d'épissage 5' de bcl-x_L (X5). La piste t = 0 (piste 10) consiste à l'incubation du transcrit S2.13 dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures sur glace. Les produits d'épissage de ces réactions furent amplifiés par RT-PCR, migrés sur gel d'acrylamide.

Le remplacement des régions B2 et B3 par des séparateurs produit le même profil d'épissage que les délétions.

Nous avons par la suite voulu nous assurer que les effets observés dans l'épissage avec les transcrits S2.13ΔB2 et S2.13ΔB3 n'étaient pas dus à un rapprochement inapproprié des deux sites d'épissage 5' de l'exon 2 ou encore au déplacement d'un élément qui pourrait se trouver à proximité d'une des délétions. Afin de réfuter ces deux éventualités, les régions B2 et B3 ont été remplacées par des séparateurs d'une taille similaire. Tout d'abord, deux premiers transcrits furent produits (S2.13ΔB2λ+ et

S2.13 Δ B2 λ -) dans lesquels la région B2 fut remplacée par une séquence de 73 nt provenant du génome du bactériophage lambda (région correspondant à la position 16611 à 16683 du génome) insérée dans les deux orientations. La région B3 fut remplacée par un séparateur de 65 nt provenant du plasmide pBluescript K+ pour former le transcrit S2.13 Δ B3s. Les trois nouveaux transcrits possédant des séparateurs furent épissés dans un extrait nucléaire de cellules HeLa. Les produits d'épissage furent amplifiés par RT-PCR, chargés sur un gel d'acrylamide qui fut par la suite exposé sur film. Le profil d'épissage obtenu pour chacun des nouveaux transcrits fut comparé à celui obtenu avec le transcrit de type sauvage, S2.13. Comparativement à ce dernier, l'épissage des transcrits S2.13 Δ B2 λ + et S2.13 Δ B2 λ - mène à la production de l'isoforme Bcl-x_L seulement (Fig. 5, comparer respectivement les pistes 3 et 4 avec la piste 2), reproduisant ainsi le profil d'épissage déjà observé avec le transcrit S2.13 Δ B2 (Fig. 3B, piste 3). En ce qui concerne l'épissage du transcrit S2.13 Δ B3s, la comparaison de son profil d'épissage avec celui de S2.13 montre que le remplacement de la région B3 par un séparateur permet de favoriser l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_S (Fig. 5, comparer la piste 5 avec la piste 2). Cet effet obtenu avec S2.13 Δ B3s réplique le résultat déjà obtenu avec le transcrit S2.13 Δ B3 (Fig. 3B, piste 4). Donc, comme l'utilisation de séparateurs à l'endroit des régions B2 et B3 permet de reproduire les mêmes effets que lorsque ces régions sont supprimées du transcrit, nous pouvons en déduire que les effets observés sur l'épissage avec les transcrits S2.13 Δ B2 et S2.13 Δ B3 seraient bel et bien causés par la suppression de régulateurs d'épissage se trouvant dans ces régions et non par le rapprochement des sites d'épissage ou d'autres sites régulateurs.

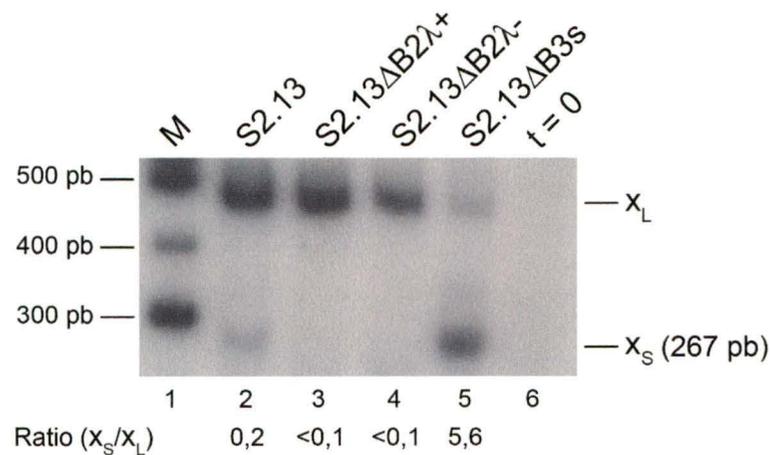


Figure 5. Le remplacement des régions exoniques B2 et B3 par des séparateurs permet d'obtenir le même profil d'épissage que lorsque ces régions sont déléetées. Les transcrits S2.13 (piste 2), S2.13ΔB2λ+/- (dont les régions B2 furent remplacées par une séquence du génome du bactériophage lambda dans les deux orientations) (pistes 3 et 4) et S2.13ΔB3s (ayant une séquence du vecteur pBluescript K+ à l'endroit de la région B3) (piste 5) furent incubés dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures à 30 °C. S2.13 fut aussi incubé sur glace dans les même conditions afin d'obtenir le contrôle t = 0 (piste 6). Les ARNs furent amplifiés par RT-PCR et migrés sur gel d'acrylamide.

C. Une sous-région de B2 est responsable de l'activité de cet élément

Vu l'effet très marqué de la délétion de B2 sur l'épissage, nous nous sommes attardés sur cet élément et avons décidé de vérifier quelles étaient la ou les sous-régions de ces 77 nt responsables de l'activité de l'élément B2. Afin d'effectuer cette vérification, nous avons procédé à la dissection de cette région en construisant différents transcrits possédant des délétions plus petites de la région B2. Trois nouveaux transcrits ayant chacun une délétion différente de la région B2, furent créés. Un premier transcrit

(S2.13ΔB2G) possédant une délétion des 30 premiers nucléotides de la région B2 (positions +10 à +39 par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_S) fut construit (Fig. 6A). De plus, un deuxième (S2.13ΔB2.1) et un troisième transcrit (S2.13ΔB2.2) furent produits et correspondent respectivement à une délétion des 22 derniers nucléotides (position +66 à +87) et des 48 derniers nucléotides (position +40 à +87) de l'élément B2. La délétion comprise dans ce dernier transcrit (S2.13ΔB2.2) comprend la séquence riche en pyrimidine CRCE2 reportée précédemment (Massiello et al., 2004).

Les trois nouveaux transcrits ainsi que S2.13 furent incubés dans un extrait nucléaire de cellules HeLa dans des conditions d'épissage. Les produits furent amplifiés par RT-PCR pour ensuite être chargés sur un gel d'acrylamide et exposés sur film. La comparaison entre le résultat d'épissage de S2.13 et de S2.13ΔB2G montre que la délétion des 30 premiers nucléotides de la région B2 (correspondant à la région B2G) inhibe l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_S (Fig. 6B, comparer la piste 4 avec la piste 2). Ce résultat obtenu avec la construction S2.13ΔB2G reproduit exactement l'effet observé en épissage avec le transcrit S2.13ΔB2 (Fig. 6B, comparer la piste 4 avec la piste 3). De plus, en comparant les profils d'épissage obtenus avec les transcrits S2.13ΔB2.1 et S2.13ΔB2.2 avec celui de S2.13, nous pouvons remarquer une légère diminution de la formation de l'isoforme Bcl-x_S lorsqu'une ou l'autre des délétions est présente (Fig. 6B, comparer les pistes 5 et 6 avec la piste 2). L'effet observé est plus prononcé dans le cas où il y a délétion de la plus grande région B2.2. Ces résultats nous permettent d'affirmer que la région B2G semble principalement responsable de l'effet produit par l'élément B2 étant donné que, tout comme l'élément

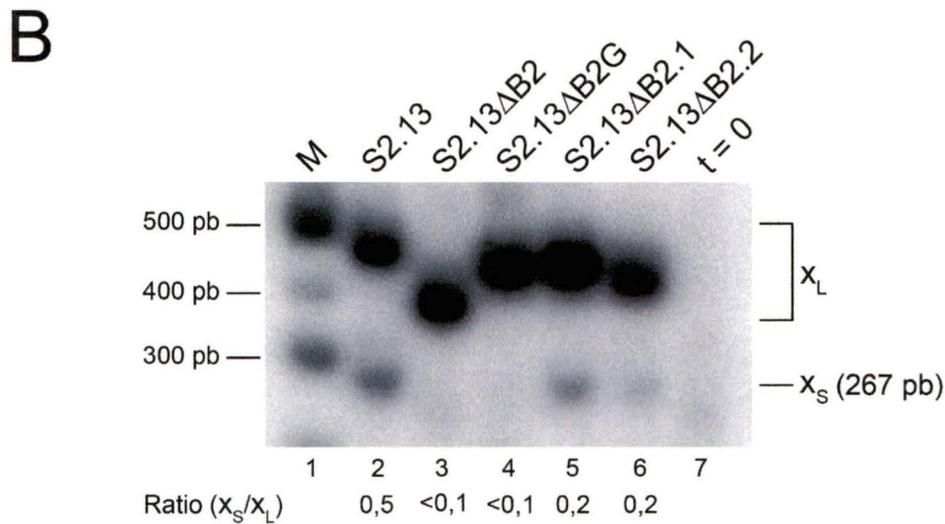
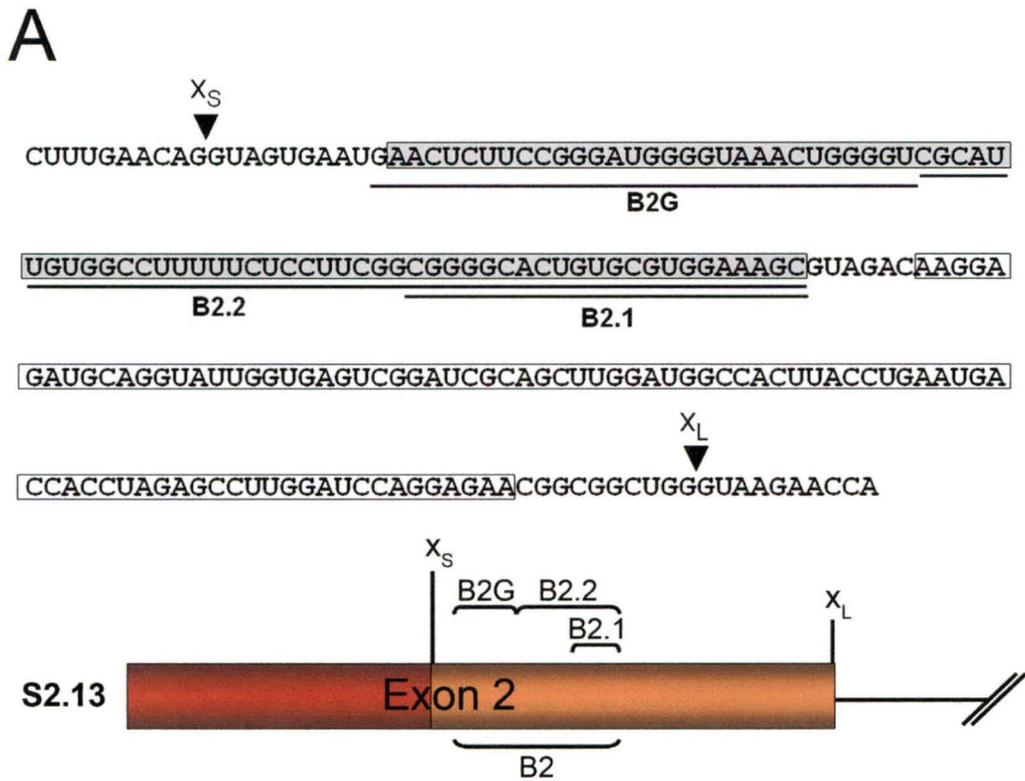


Figure 6. La sous-région B2G de l'élément B2 est principalement responsable de l'effet de cet élément sur l'épissage du transcrit S2.13. A, Séquence de la région séparant les sites d'épissage 5' de Bcl- x_S et Bcl- x_L et localisation des régions ayant été déléetées. Les sites d'épissages sont indiqués et les régions B2 et B3 sont encadrées respectivement en gris et blanc. Les régions B2G, B2.1 et B2.2 sont soulignées. Schéma démontrant la localisation sur le transcrit initial S2.13 des sous-régions de

l'élément B2 ayant été supprimées. **B**, Incubation pendant 2 heures à 30 °C dans un extrait nucléaire de cellules HeLa des transcrits S2.13 (piste 2), S2.13ΔB2 (piste 3) et des transcrits comportant des délétions de sous-régions de l'élément B2 soit : S2.13ΔB2G (piste 4), S2.13ΔB2.1 (piste 5) et S2.13ΔB2.2 (piste 6). Le transcrit S2.13 fut aussi incubé dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heure sur glace pour donner le contrôle t = 0 (piste 7). Les ARNs de chaque échantillon furent par la suite amplifiés par RT-PCR et chargés sur gel d'acrylamide.

B2, la présence de B2G semble essentiel à la formation de l'isoforme Bcl-x_S dans un extrait nucléaire de cellules HeLa. Cependant, les régions B2.1 et B2.2 semblent aussi contribuer à l'effet provoqué par l'élément B2 mais, cette contribution semble d'une importance moindre que celle de la région B2G.

D. La région B2G possède une séquence riche en G pouvant lier les protéines hnRNP F et H

Comme l'élément B2G semble être la principale région responsable de l'effet de B2, nous avons voulu vérifier de plus près son mode d'action. En inspectant visuellement la séquence de B2G, nous avons pu y trouver une section riche en G située à la position +20 à +38 par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_S (GGGAUGGGGUAAACUGGGG). Des séquences d'ARN constituées de séries de G, semblables à celle retrouvée dans la région B2G, sont souvent connues comme étant des sites de liaison pour les protéines de la famille de hnRNP H qui est constituée des protéines hnRNP H, F, H' et 2H9 (Caputi et Zahler, 2001). Sachant ceci, nous avons donc trouvé intéressant de vérifier si notre séquence riche en G pouvait être liée par ces protéines. Afin d'y parvenir, nous avons effectué une

expérience de retardement sur gel en utilisant un oligo d'ARN composé de la séquence riche en G correspondant à la position +16 à +42 par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_S (B2G : UUCCGGGAUGGGGUA AACUGGGGUCGC) en combinaison avec les protéines his-hnRNP F et his-hnRNP H. Ces protéines recombinantes possèdent une étiquette 6 X-histidine en N-terminal et ont été exprimées en cellules d'insecte infectées au baculovirus. Afin de déterminer la pureté des préparations, 30 pmoles de chaque protéine fut chargé sur un gel d'acrylamide/SDS qui fut par la suite coloré au bleu de Coomassie (Fig. 7A). Les deux préparations contiennent quelques impuretés mineures.

L'oligo B2G radiomarké en 5' fut mis en présence ou en absence d'une concentration de 2,5 µM de protéines totales et les échantillons furent par la suite chargés sur gel d'acrylamide natif. Par l'analyse du résultat obtenu, nous pouvons en premier lieu remarquer la formation d'un complexe lorsque la protéine his-hnRNP F est mise en présence de l'oligo B2G radiomarké (Fig. 7B, comparer la piste 2 avec la piste 1). De plus, l'ajout de his-hnRNP H provoque aussi la formation d'un complexe avec cet oligo d'ARN (Fig. 7B, comparer la piste 11 avec la piste 1). Cette expérience montre bien que la région B2G peut être liée par les protéines hnRNP F et hnRNP H.

Afin de vérifier la spécificité de liaison de ces protéines à la séquence B2G, nous avons ajouté aux échantillons contenant l'oligo radiomarké et les protéines une quantité croissante d'oligos compétiteurs non radiomarkés. Dans un premier temps, nous avons utilisé l'oligo B2G comme compétiteur afin de nous assurer que l'essai de

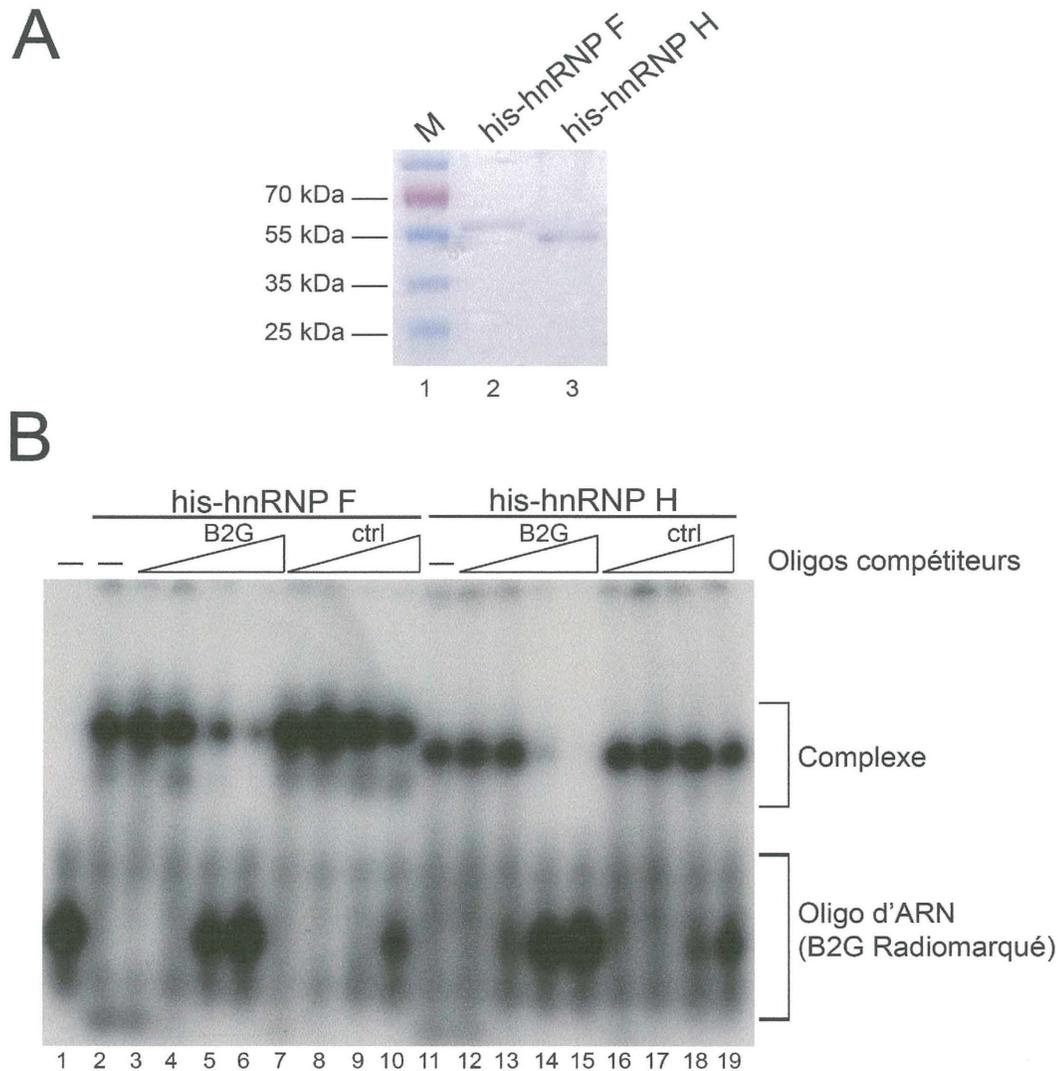


Figure 7. Les protéines his-hnRNP F et his-hnRNP H peuvent lier la séquence riche en G de l'élément B2G de Bcl-x. **A**, 30 pmoles des préparations des protéines his-hnRNP F et his-hnRNP H furent chargées sur un gel d'acrylamide/SDS qui a par la suite été coloré au bleu de Coomassie. **B**, Gel de retardement effectué en utilisant 5000 cpm (environ 75 nM) un oligonucléotide d'ARN radiomarqué (B2G) correspondant à la séquence riche en G de l'élément B2G. Cet oligo fut mis en absence (piste 1) ou en présence de 2,5 μ M des protéines recombinantes his-hnRNP F (piste 2) ou his-hnRNP H (piste 3). Une compétition pour la liaison des protéines à B2G fut effectuée en utilisant des concentrations croissantes d'oligonucléotides compétiteurs non radiomarqués (1, 10, 100 et 500 fois plus de compétiteurs que d'oligos radiomarqués). La même séquence non radiomarqué fut utilisé, soit B2G (pistes 3 à 6 avec his-hnRNP F et 12 à 15 avec his-hnRNP H) ainsi qu'une séquence contrôle riche en G nommé ctrl (pistes 7 à 10 avec his-hnRNP F et 16 à 19 avec his-hnRNP H). 40 μ g d'héparine fut ajouté aux échantillons d'un volume de 8 μ l. Les échantillons ont été chargés et migrés sur gel d'acrylamide natif.

compétition fonctionne. Dans un deuxième temps, un oligo contrôle (ctrl) possédant une séquence riche en G (GGUAGCUGGAUUGUAGCUGCGGGUACCUUUAGAGUAGGCC) fut aussi utilisé afin de mettre à l'épreuve la spécificité de liaison des protéines à la séquence B2G. Comme prévu, l'ajout de quantités croissantes de B2G compétiteur aux échantillons (1, 10, 100 et 500 fois plus de compétiteurs que d'oligos radiomarqués) permet d'empêcher presque totalement la formation du complexe entre his-hnRNP F et l'oligo B2G radiomarqué (Fig. 7B, pistes 3 à 6) et va même jusqu'à empêcher complètement la formation du complexe entre his-hnRNP H et B2G (Fig. 7B, pistes 12 à 15). Par ailleurs, l'ajout des mêmes quantités de l'oligo ctrl compétiteur entraîne une déstabilisation nettement moins importantes que l'oligo B2G du complexe formé entre le B2G radiomarqué et les protéines his-hnRNP F et his-hnRNP H (Fig. 7B, pistes 7 à 10 et 16 à 19 respectivement). Ce résultat montre que les protéines hnRNP F et hnRNP H peuvent lier l'élément B2G de façon spécifique.

Comme les préparations des protéines his-hnRNP F et H recombinantes ne sont pas totalement pures, nous avons voulu vérifier si les complexes observés sur le gel de retardement étaient vraiment causés par la liaison des protéines hnRNP F et H recombinantes et non par des contaminants. Pour ce faire, nous avons effectué un deuxième gel à retardement en utilisant encore une fois l'oligonucléotide d'ARN B2G mis en présence ou en absence de 2,5 μ M de la protéine his-SRp30c qui, comme les protéines his-hnRNP F et H, est exprimée en cellules d'insecte infectées au baculovirus, purifiée sur colonne de nickel mais qui ne devrait pas lier la séquence de

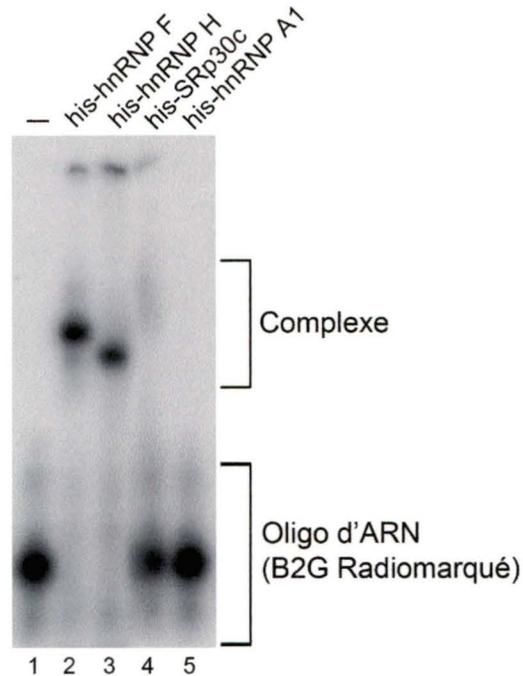


Figure 8. La séquence riche en G de l'élément B2G n'est pas liée par la protéine his-hnRNP A1. Gel de retardement fait avec l'oligonucléotide d'ARN B2G (constitué de la séquence riche en G de l'élément B2G) radiomarqué en 5'. L'ARN fut mis en absence (piste 1) ou en présence de 2,5 μ M de différentes protéines recombinantes : his-hnRNP F (piste 2), his-hnRNP H (piste 3), his-SRp30c (piste 4) et his-hnRNP A1 (piste 5). Les cinq échantillons furent migrés sur gel d'acrylamide natif.

l'oligo B2G. Nous avons aussi fait cette expérience avec une autre protéine hnRNP purifiée, soit la protéine his-hnRNP A1 aussi utilisée à une concentration de 2,5 μ M et qui est, quant à elle, purifiée en bactéries. Les protéines his-hnRNP F et his-hnRNP H furent aussi utilisées à une concentration de 2,5 μ M à titre de contrôles positifs. Comme attendu, les protéines hnRNP F et H provoquent la formation d'un complexe lorsque mises en présence de l'oligo B2G (Fig. 8, comparer respectivement les pistes les pistes 2 et 3 avec la piste 1). Par contre, lorsque his-SRp30c est utilisée avec cet oligo, la formation d'un complexe très mineur est obtenu avec cette préparation lorsque comparé à ceux obtenus avec les protéines his-hnRNP F et H (Fig. 8,

comparer la piste 4 avec les pistes 1, 2 et 3). De plus, l'utilisation de his-hnRNP A1 avec l'oligo B2G ne provoque aucune formation de complexe visible (Fig. 8, comparer la piste 5 avec la piste 1). Ce résultat suggère donc que les protéines hnRNP F et H sont bien responsables des complexes formés.

E. La dernière série de G de l'élément B2G est importante pour la liaison des protéines hnRNP F et H

Sachant que la séquence riche en G de B2G pouvait être liée par les protéines hnRNP F et H, nous avons voulu vérifier si les séries de G de cet élément étaient importantes pour la liaison des protéines hnRNP F et H et si c'est le cas, lesquelles pouvaient être impliquées dans la liaison de ces protéines. Pour faire ces vérifications, nous avons effectué une expérience de retardement sur gel en utilisant des oligos d'ARN possédant des mutations dans certaines séries de G. Un premier oligo utilisé (Mut1) possède une mutation dans la dernière série de quatre G, consistant en un changement de GGGG pour GCCG (Fig. 9A). Un deuxième oligo (Mut2) possède la même mutation mais dans les deux dernières séries de G. L'oligo contenant les trois séries de G intactes (B2G) et les deux oligos possédant les mutations ont été radiomarqués et incubés avec ou sans 2,5 µM de his-hnRNP F.

L'analyse des résultats obtenus montre que l'oligo d'ARN B2G en présence de his-hnRNP F ou de his-hnRNP H forme bel et bien un complexe, comme montré

précédemment (Fig. 9B pistes 1, 2 et 3) Lorsque la dernière série de G est mutée sur l'oligo d'ARN (Mut1), la formation d'un faible complexe est visible lors d'ajout de his-hnRNP F (Fig. 9B, comparer la pistes 4 avec la piste 5), mais aucun complexe n'apparaît lorsque la protéine his-hnRNP H est utilisée (Fig. 9B, comparer la pistes 4 avec la piste 6). En utilisant l'oligo Mut2, dont les deux dernières séries de G sont mutées, aucun complexe ne se forme lorsque les protéines his-hnRNP F et H (Fig. 9B, comparer la pistes 7 avec les pistes 8 et 9). Ces résultats suggèrent que les séries de G retrouvées dans l'élément B2G sont importantes pour la liaison des protéines hnRNP F/H et que la présence des deux dernières séries de G est essentielle à leur liaison.

F. Les deux dernières séries de G de l'élément B2G sont essentielles pour son activité dans l'épissage

Comme la mutation de la dernière ou des deux dernières séries de G de l'élément B2G empêche la liaison de hnRNP F et H, nous avons voulu vérifier si ces mutations, lorsque introduites dans des transcrits, pouvaient avoir un effet sur le choix des sites d'épissage 5' de l'intron 2 de Bcl-x et corrélérer ainsi avec la perte de liaison observée.

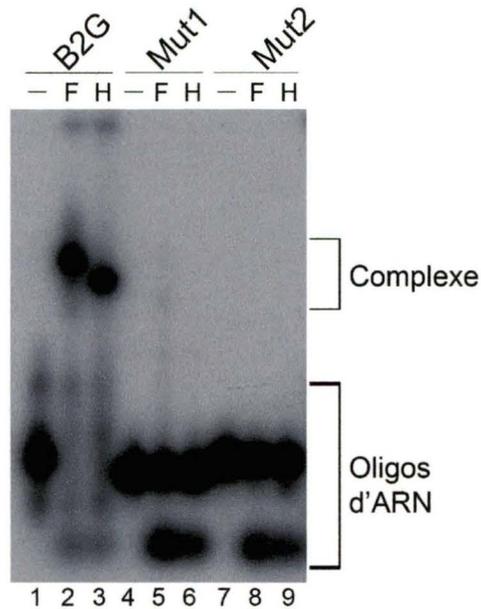
Pour répondre à cette question, nous avons construit deux nouveaux transcrits possédant les mêmes mutations que celles retrouvées sur les oligos Mut-1 et Mut-2.

Le transcrit S-Mut1 possède la mutation de la dernière série de G de l'élément B2G (GGGG changé pour GCCG) et le transcrit S-Mut2 possède les deux dernières séries de G mutées de la même façon. Ces deux nouveaux transcrits ainsi que le transcrit

A

W-T GGGATGGGGTAAACTGGGG
 Mut1 GGGATGGGGTAAACTG**CCG**
 Mut2 GGGATG**CCG**TAAACTG**CCG**

B



C

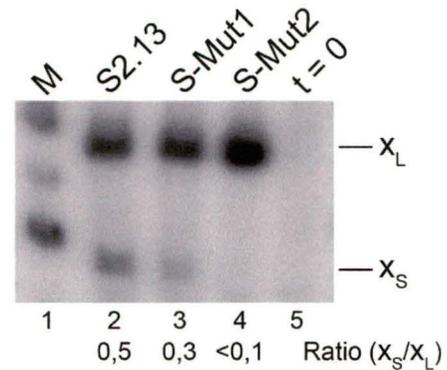


Figure 9. Les séries de G de l'élément B2G sont importantes pour la liaison des protéines hnRNP F et H et ainsi que pour l'activité de cet élément. A, Représentation des mutations apportées aux séries de G de l'élément B2G. Les séries de G sont soulignées et les mutations effectuées sont surlignées en noir. **B,** Gel de retardement effectué avec trois oligonucléotides radiomarqués différents en présence ou en absence de 2,5 μ M de protéines his-hnRNP F et H. Les trois oligos utilisés sont : B2G formé de la séquence riche en G de type sauvage de la région B2G (pistes 1 à 3), Mut1 ayant la dernière série de G mutée (pistes 4 et 6) et Mut2 ayant les deux dernières séries de G mutées (pistes 7 et 9). Chaque échantillon fut chargé et migré sur gel d'acrylamide natif. **C,** Les transcrits S2.13 (piste 2) ainsi que S-Mut1 et S-Mut2 (piste 3 et 4) possédant les mutations décrites dans le panneau A, furent incubés dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures à 30 °C. Le transcrit S2.13 fut aussi utilisé afin de faire un contrôle t = 0 (piste 5), incubé sur glace dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures. Les ARNs furent par la suite amplifiés par RT-PCR, migrés sur gel d'acrylamide et quantifiés sur InstantImager.

S2.13 furent épissés *in vitro* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa, les produits d'épissage furent amplifiés par RT-PCR et chargés sur un gel d'acrylamide.

En analysant le résultat obtenu, une diminution de l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_S est notable lorsque le profil d'épissage du transcrit S-Mut1 est comparé à celui de S2.13 (Fig. 9C, comparer la piste 3 avec la piste 2). En observant le profil d'épissage du transcrit S-Mut2, nous remarquons que la mutation des deux dernières séries de G empêche presque complètement la formation de l'isoforme Bcl-x_S (Fig. 9C, comparer la piste 4 avec la piste 2), reproduisant ainsi les profils d'épissage obtenus précédemment avec les transcrits S2.13ΔB2 et S2.13ΔB2G. Cette expérience montre donc que les deux dernières séries de G de l'élément B2G sont importantes pour la formation de l'isoforme pro-apoptotique Bcl-x_S.

G. L'épissage in vitro de Bcl-x peut être modulé par l'ajout de protéines hnRNP F et H recombinantes

Étant donné que les protéines hnRNP F et H lient l'élément B2G et que la mutation ou la délétion du site de liaison provoque une altération dans le choix des sites d'épissage, nous avons voulu vérifier si l'ajout de ces protéines recombinantes à une réaction d'épissage permettrait de provoquer un changement dans la sélection des sites d'épissage 5' de l'intron 2 de Bcl-x. Pour répondre à cette question, nous avons épissé le transcrit S2.13 dans un extrait nucléaire de cellules HeLa en ajoutant à la

réaction des quantités croissantes des protéines his-hnRNP H ou his-hnRNP F. Les produits d'épissage furent ensuite amplifiés par RT-PCR et chargés sur un gel d'acrylamide. En comparant les profils d'épissage du transcrit S2.13 mis en présence de la protéine his-hnRNP H (0,7, 1,1 et 1,5 nM) à celui obtenu sans ajout de protéines recombinantes, nous remarquons une légère augmentation de la production de l'isoforme Bcl-x_S. (Fig. 10A, comparer les pistes 3 à 5 avec la piste 2). De la même façon, lorsque la protéine his-hnRNP F est ajoutée à des concentrations croissantes (0,7, 1,1, 1,5 et 2,2 nM) à la réaction d'épissage, une augmentation de l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_S, similaire à celle obtenue avec his-hnRNP H, est aussi remarquée (Fig. 10A, comparer les pistes 6 à 9 avec la piste 2). Une plus grande quantité de his-hnRNP F a été ajoutée à la réaction d'épissage puisque la préparation de cette dernière était plus concentrée que la préparation de his-hnRNP H. L'ajout de protéines hnRNP F et H à une réaction d'épissage *in vitro* permet donc de moduler l'épissage du transcrit S2.13 en favorisant la formation de Bcl-x_S.

Nous avons voulu nous assurer que l'effet observé sur le profil d'épissage par l'ajout des protéines hnRNP F et H n'était pas un effet général causé par certaines protéines hnRNP déjà connues pour favoriser la sélection des sites d'épissage distaux (Yang et al., 1994). Pour ce faire, nous avons fait l'épissage *in vitro* du transcrit S2.13 en présence d'une autre protéine hnRNP recombinante, soit la protéine his-hnRNP A1. L'épissage fut effectué dans un extrait nucléaire de cellules HeLa en utilisant des concentrations de protéines his-hnRNP A1 équivalentes à celles utilisées pour la protéine hnRNP F (soit 0,7, 1,1, 1,5 et 2,2 nM). Les produits d'épissage furent par la

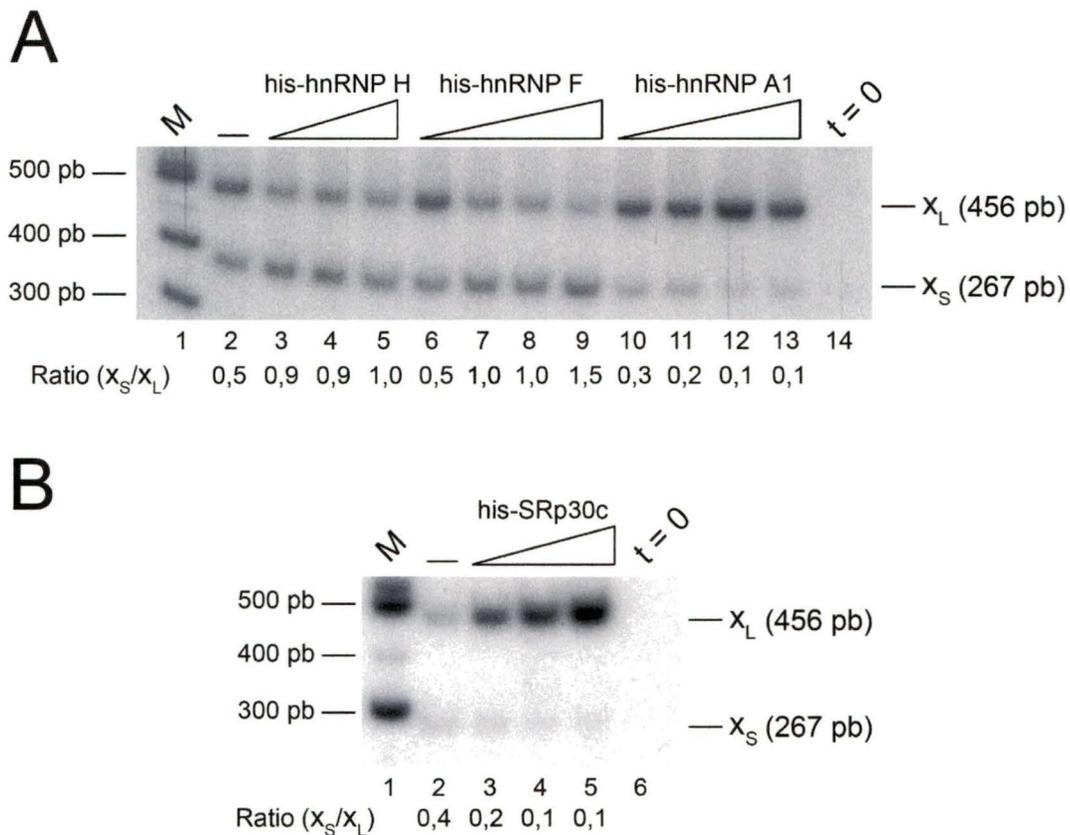


Figure 10. L'ajout de his-hnRNP F ou H dans une réaction d'épissage *in vitro* favorise la formation de l'isoforme Bcl- x_S , alors que l'ajout de his-hnRNP A1 ou de his-SRp30c favorise la formation de l'isoforme Bcl- x_L . **A**, Le transcrit de type sauvage S2.13 fut épissé *in vitro* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures à 30 °C en absence (piste 2) ou en présence de concentrations croissantes des protéines his-hnRNP H (0,7, 1,1 et 1,5 μM) (pistes 3 à 5), his-hnRNP F (0,7, 1,1, 1,5 et 2,2 μM) (pistes 6 à 9) ou hnRNP A1 (0,7, 1,1, 1,5 et 2,2 μM) (pistes 10 à 13). Un contrôle $t = 0$ (piste 14) fut aussi effectué en incubant le transcrit S2.13 dans un extrait nucléaire de cellules HeLa sur glace pendant 2 heures. Les ARNs furent par la suite amplifiés par RT-PCR et les produits de PCR furent chargés sur gel d'acrylamide et quantifiés par InstantImager. **B**, Le transcrit de type sauvage S2.13 fut épissé *in vitro* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures à 30 °C en absence (piste 2) ou en présence de concentrations croissantes de protéines his-SRp30c (0,7, 1,1 et 1,5 μM) (pistes 3 à 5). Un contrôle $t = 0$ (piste 6) fut aussi effectué en incubant le transcrit S2.13 dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures sur glace. Les ARNs furent par la suite amplifiés par RT-PCR et les produits de PCR furent chargés sur gel d'acrylamide et quantifiés par InstantImager.

suite amplifiés par RT-PCR et chargés sur gel d'acrylamide. La comparaison des profils d'épissage obtenus par l'ajout de his-hnRNP A1 à celui obtenu avec le transcrit S2.13 épissé sans ajout de protéines montre que l'ajout de hnRNP A1 promouvoit la formation de l'isoforme anti-apoptotique Bcl-x_L au détriment de l'isoforme Bcl-x_S (Fig. 10A, comparer les pistes 10 à 13 avec la piste 2). Ce résultat suggère que les effets observés dans l'épissage lors d'ajout des protéines hnRNP F et H ne sont pas dus à un effet général des protéines hnRNP. En fait, l'ajout de protéine hnRNP A1 recombinante semble avoir l'effet inverse des protéines hnRNP F et H et pourrait suggérer que hnRNP A1 antagonise l'effet des protéines hnRNP F et H endogènes.

En plus, afin de s'assurer que l'effet des protéines his-hnRNP F et H n'était pas causé par des protéines contaminantes pouvant se trouver dans les préparations de protéines, nous avons vérifié l'effet d'une autre protéine qui est aussi exprimée en cellules d'insecte et purifiée sur colonne de nickel, soit his-SRp30c. L'épissage fut effectué dans un extrait nucléaire de cellules HeLa en absence ou en présence de concentrations croissantes de his-SRp30c (0,7, 1,1 et 1,5 μ M). Les produits d'épissage furent par la suite amplifiés par RT-PCR et chargés sur gel d'acrylamide. L'analyse du résultat montre que la présence de his-SRp30c stimule la formation de l'isoforme Bcl-x_L (Fig. 10B, comparer les pistes 3 à 5 avec la piste 2) contrairement aux protéines his-hnRNP F ou H qui stimulent la formation de l'isoforme Bcl-x_S lorsqu'ils sont ajoutées à la réaction d'épissage. Ce résultat suggère que, non seulement l'effet obtenu par les protéines his-hnRNP F et H n'est pas causé par un contaminant, mais

qu'en plus, la protéine SRp30c semble agir sur l'épissage de Bcl-x en favorisant la formation de l'isoforme anti-apoptotique Bcl-x_L.

H. L'effet de his-hnRNP F sur l'épissage de Bcl-x se ferait via l'élément B2G

Comme la délétion ou la mutation de l'élément B2 réprime la formation de Bcl-x_S et que l'ajout de protéines hnRNP F et H liant cet élément favorise sa production, ces résultats suggèrent que les protéines hnRNP F et H confère à l'élément B2, au moins en partie, la capacité de promouvoir la formation de l'isoforme pro-apoptotique. Afin de confirmer cette proposition, nous avons effectué un épissage *in vitro* en utilisant les transcrits S2.13, S-Mut1 et S-Mut2 qui ont chacun été mis en absence ou en présence de 1,5 et 2,2 nM de his-hnRNP F. Ainsi, si l'effet de cette protéine se fait via l'élément B2, aucun changement dans le profil d'épissage de S-Mut2 ne devrait être observé étant donné qu'aucune liaison n'est visible en gel de retardement. Les réactions d'épissage ont été faites dans un extrait nucléaire de cellules HeLa et les produits furent amplifiés par RT-PCR et migrés sur un gel d'acrylamide. Seule la protéine his-hnRNP F fut utilisée pour cette expérience.

Comme montré précédemment, l'ajout de his-hnRNP F lors de l'épissage du transcrit S2.13 permet d'augmenter significativement l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_S (Fig. 11A, comparer les pistes 3 et 4 avec la piste 2). Une modulation est aussi

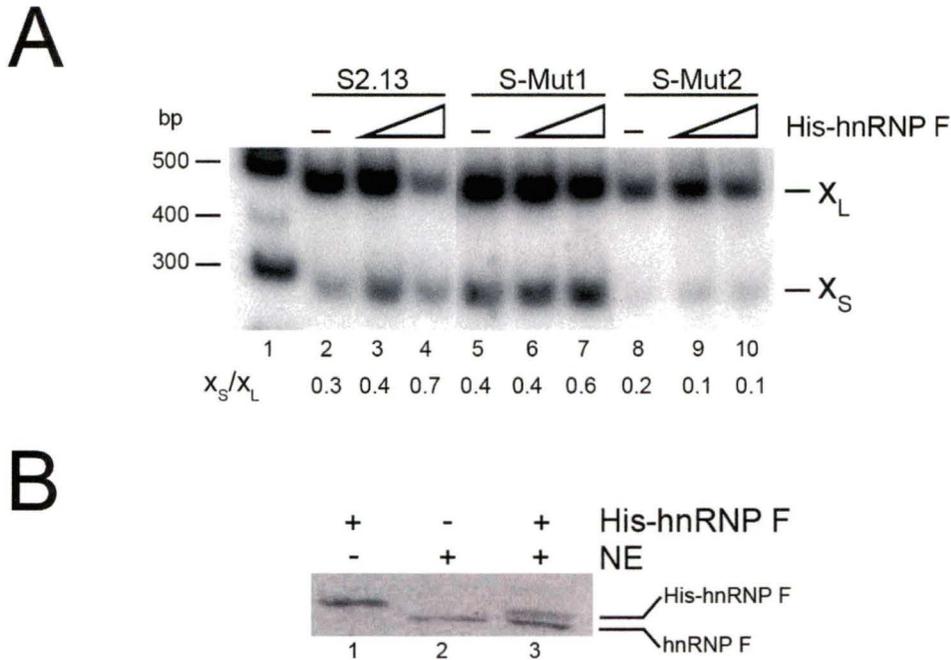


Figure 11. La présence des deux dernières séries de G de l'élément B2G est essentielle pour l'activité de la protéine his-hnRNP F sur l'épissage de bcl-x. **A**, Incubation des transcrits S2.13 (pistes 2, 3 et 4), S-Mut1 (pistes 5, 6 et 7) et S-Mut2 (pistes 8, 9 et 10) dans un extrait nucléaire de cellules HeLa pendant 2 heures à 30 °C en absence ou en présence de 1,5 et 2,2 μ M de protéines his-hnRNP F. Les ARNs furent amplifiés par RT-PCR et migrés sur un gel d'acrylamide. **B**, La quantité de protéines recombinantes maximale utilisée dans la réaction d'épissage *in vitro* (30 pmoles) fut chargée sur gel d'acrylamide/SDS (piste 1), une quantité d'extrait nucléaire équivalente à celle utilisée en épissage *in vitro* fut aussi chargée sur le gel (piste 2) et l'équivalent des deux premiers échantillons furent chargés ensemble sur la même piste (piste 3). Après migration, les protéines furent transférées sur membrane de nitrocellulose et un immunobuvardage de type Western fut effectué en utilisant un anticorps anti-hnRNP F.

observable pour S-Mut1 lorsque la protéine his-hnRNP F est ajouté à la réaction d'épissage (Fig. 11A, comparer les pistes 6 et 7 avec la piste 5). Cependant, lorsque le transcrit S-Mut2 est épissé en présence des mêmes quantités de his-hnRNP F ajoutées à la réaction, aucune augmentation de Bcl- x_S n'est visible (Fig. 11A, comparer les pistes 9 et 10 avec la piste 8). Ce résultat nous montre donc que les deux dernières

séries de G de l'élément B2G doivent être présentes pour que la protéine hnRNP F puisse promouvoir l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_s.

Nous avons voulu, par la suite, vérifier si les quantités de his-hnRNP F recombinant ajoutées aux réactions d'épissage se situaient à un niveau similaire à celui retrouvé dans les extraits nucléaires de cellules HeLa utilisés. Afin de vérifier ceci, la quantité maximale de his-hnRNP F utilisée lors des réactions d'épissage (30 pmol) fut chargée sur gel d'acrylamide/SDS dans une première piste. La quantité d'extrait nucléaire utilisée pour les épissages *in vitro* (5 µl) fut chargée dans une deuxième piste et ces deux échantillons furent chargés simultanément dans une troisième piste. Les protéines furent transférées sur membrane de nitrocellulose et détectées par

immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps anti-hnRNP F. La détection montre que la quantité de protéines recombinantes maximale utilisée dans l'épissage est similaire à celle se trouvant dans une quantité d'extrait nucléaire identique à celle utilisée lors d'épissage *in vitro* (Fig. 11B, comparer les pistes 1 et 2). Ce résultat nous permet donc de nous assurer que la quantité de protéines recombinantes ajoutée aux réactions d'épissage précédentes, est comparable aux niveaux de hnRNP F endogènes retrouvés dans les extraits nucléaires utilisés.

Discussion

Bcl-x, un gène apoptotique épissé alternativement, produit des isoformes ayant des effets antagonistes dans l'apoptose. L'épissage de ce gène doit d'être régulé rigoureusement afin que l'apoptose soit régulé correctement. La compréhension des mécanismes d'épissage de ce gène permettra de mieux comprendre la régulation du processus de suicide cellulaire qu'est l'apoptose ainsi que sur le cancer et les résistances aux médicaments anti-cancéreux. Jusqu'à maintenant, nos résultats suggèrent qu'aucun élément régulateur ne serait présent dans les 1200 premiers nucléotides de l'intron 2. Cependant, nos présentes recherches montrent que deux régions régulatrices, situées entre les deux sites d'épissage 5' de l'exon 2, se retrouvent sur le pré-ARNm de Bcl-x. Une première région appelée B2 permettrait de favoriser la formation de l'isoforme pro-apoptotique Bcl-x_S, alors qu'une deuxième région nommée B3 favoriserait la formation de l'isoforme anti-apoptotique Bcl-x_L. Nous montrons aussi qu'une sous-région B2G est principalement responsable de l'activité de la région B2 et que cette sous-région renferme une séquence constituée de séries de G pouvant être liée par les protéines hnRNP F et H. La dernière ou les deux dernières séries de G de l'élément B2G sont importantes pour la liaison de la protéine hnRNP F à cette séquence ainsi que pour le bon fonctionnement de l'élément B2G en épissage. Nos études montrent que l'ajout de protéines hnRNP F ou hnRNP H à une réaction d'épissage *in vitro* permet de moduler l'épissage de Bcl-x en favorisant la formation de l'isoforme Bcl-x_S. L'effet de hnRNP F et H n'est pas un effet général des protéines hnRNPs puisque l'ajout de la protéine hnRNP A1 dans une réaction

d'épissage *in vitro*, produit l'effet inverse et favorise la formation de l'isoforme Bcl-x_L. De plus, cet effet ne serait pas causé par un contaminant pouvant être retrouvé dans les préparations de protéines puisque l'ajout de his-SRp30c provenant de cellules d'insecte et purifiée sur colonne de nickel produit, aussi l'effet inverse en favorisant la formation de l'isoforme Bcl-x_L. Nous avons également montré que la protéine hnRNP F agit sur l'épissage de Bcl-x via la région B2G. Quant à hnRNP A1 et SRp30c, leur effet sur l'épissage de Bcl-x serait médié par une autre région que B2G.

Absence d'élément régulateur dans le premier 1200 nt de l'intron 2.

L'analyse visuelle par alignement des premiers 1200 nucléotides de l'intron 2 du pré-ARNm de Bcl-x de l'humain, de la souris et du rat nous a permis de constater que ces séquences étaient fortement conservées. Cette conservation suggère que les séquences introniques pourraient contenir un ou des éléments de contrôle de l'épissage. Comme aucun élément n'a pu être identifié, cette conservation particulièrement forte dans les 110 premiers nucléotides de l'intron 2 pourrait s'expliquer par le fait que cette séquence code pour un autre isoforme de Bcl-x, soit Bcl-x_β. Cet isoforme est formé lorsque les sites d'épissage 5' de l'exon 2 ne sont pas utilisés et qu'une partie de l'intron 2 est traduite (Gonzalez-Garcia et al., 1994; Shiraiwa et al., 1996).

La région intronique en aval du premier 110 nt pourrait néanmoins contenir des éléments de contrôle de l'épissage, mais le système cellulaire utilisé pourrait ne pas être approprié pour révéler leur rôle. En effet, comme ce résultat fut obtenu dans un extrait nucléaire de cellules HeLa, il est possible que certaines de ces séquences contenues dans l'une ou l'autre des délétions pourraient affecter l'épissage de Bcl-x dans d'autres types cellulaires ou encore dans des cellules en apoptose. L'utilisation dans l'épissage *in vitro* d'extraits nucléaires faits à partir de différents types cellulaires ou de cellules en apoptose pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. De plus, comme seulement les 1192 premiers nucléotides de l'intron 2 sont présents dans notre transcrit S2.13, il est possible que d'autres régions régulatrices de l'épissage soient présentes plus en aval dans l'intron 2 naturel de Bcl-x. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet de l'ajout de séquences introniques sur le choix des sites d'épissage. Cependant, comme la plupart des éléments régulateurs sont habituellement trouvés à proximité des sites d'épissage, les chances de trouver une région régulant le choix des sites d'épissage 5' de l'exon 2 sont moindres au fur et à mesure que nous nous éloignons des sites d'épissage alternatifs.

Deux régions exoniques modulent l'épissage de Bcl-x.

Nos études effectuées sur l'exon 2 de Bcl-x montrent que deux régions exoniques, situées entre les deux sites d'épissage 5' de l'exon 2, permettent de moduler l'épissage alternatif de Bcl-x. En effet, la délétion de la région B2 (77 nt) empêche

complètement la formation de l'isoforme Bcl-x_S suggérant que cette région contient un ou des éléments permettant soit de favoriser l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_S, soit de réduire l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_L. D'autre part, lorsque la région B3 (86 nt) est supprimée, une augmentation de la formation de l'isoforme Bcl-x_S est observée, ce qui suggère que cette région agirait comme un activateur du site d'épissage 5' de Bcl-x_L ou encore comme un répresseur du site d'épissage 5' de Bcl-x_S.

Nous avons montré en utilisant un oligonucléotide antisens complémentaire au site d'épissage 5' de Bcl-x_L que le site d'épissage 5' de Bcl-x_S était toujours fonctionnel lorsque la région B2 était déléetée d'un transcrit. Ce résultat nous permet de penser que la région B2 n'est donc pas essentielle pour la formation de Bcl-x_S. L'absence de la région B2 semble par contre rendre le site d'épissage 5' de Bcl-x_S plus difficilement utilisable puisqu'une plus grande quantité d'oligonucléotides antisens doit être utilisée afin d'obtenir uniquement l'isoforme Bcl-x_S avec le transcrit S2.13ΔB2. Nous avons de plus éliminé la possibilité que les résultats obtenus avec les délétions des régions B2 et B3 soient causés par le rapprochement d'un élément à proximité d'un des sites d'épissage 5' en utilisant des séparateurs aux endroits des régions B2 et B3.

La région B3, vu son effet positif sur la formation de l'isoforme Bcl-x_L, pourrait être plus active que B2 chez les cellules HeLa puisque c'est cet isoforme qui est produit de façon dominante dans ces cellules. Des recherches plus approfondies devront cependant être effectuées afin de mieux caractériser les régions importantes de cet

élément ainsi que son mécanisme d'action. La construction de transcrits possédant de plus petites délétions de cette région serait un bon moyen de connaître la ou les sous-régions responsables de l'activité de cette région.

Le fait qu'une forte majorité de l'isoforme Bcl-x_L soit retrouvée chez les cellules HeLa nous indique que le rôle de la région B2, joue un rôle mineur dans ces cellules. Cependant, comme la région B2 permet de favoriser la formation de l'isoforme proapoptotique Bcl-x_S, cet élément pourrait être plus actif dans une cellule produisant une majorité de Bcl-x_S (en apoptose, par exemple). Il serait donc intéressant de vérifier si l'isoforme Bcl-x_S peut être formé dans un extrait nucléaire de cellules en apoptose lorsqu'un transcrit portant une délétion de la région B2 est utilisé. Si tel était le cas, ceci suggérerait que la formation de Bcl-x_S pourrait être favorisé via d'autres éléments retrouvés ailleurs que dans la région B2. Dans le même ordre d'idées, cet élément pourrait aussi se trouver plus actif dans d'autres types cellulaires possédant un ratio Bcl-x_S/Bcl-x_L plus grand que celui des cellules HeLa. Il pourrait donc être intéressant, tout comme pour les délétions introniques, de vérifier le comportement d'un transcrit possédant une délétion de la région B2 en épissage *in vitro* dans des extraits nucléaires types cellulaires qui produisent proportionnellement plus de Bcl-x_S.

La sous-région B2G est principalement responsable de l'effet de la région B2 et est liée par les protéines hnRNP F et H.

La dissection de la région B2 nous a permis de trouver une sous-région qui est principalement responsable de l'effet de B2 dans l'épissage. En effet, un transcrit possédant une délétion de la région B2G reproduit le même profil d'épissage qu'un transcrit ayant une délétion de B2. Une autre région, située en aval de B2G (B2.2), semble aussi contribuer de manière moins importante à l'effet de l'élément B2 puisque sa délétion provoque une légère diminution de la quantité de Bcl-x_S produit. L'analyse de la séquence de B2G nous a permis de découvrir une région riche en G (de +20 à +38 par rapport au site d'épissage 5' de Bcl-x_S) et nos expériences montrent que la présence de ces séries de G est importante pour l'activité de l'élément B2G. En effet, l'utilisation en épissage *in vitro* d'un transcrit possédant des mutations à l'endroit de la dernière série de G diminue l'efficacité de cet élément alors que la mutation des deux dernières séries de G inhibe totalement l'activité de l'élément B2G.

Nous avons aussi montré que cette séquence constituée de séries de G pouvait être liée spécifiquement par les protéines hnRNP F et hnRNP H, deux protéines de la famille de hnRNP H. De plus, nos résultats révèlent que les séries de G de l'élément B2G sont importantes pour la liaison des protéines hnRNP F et H puisque l'insertion de mutations dans la dernière ou les deux dernières séries de G inhibe complètement la liaison de ces protéines à cette séquence.

L'absence de liaison observée entre hnRNP F/H et la séquence riche en G possédant la mutation des deux dernières séries de G corrèle avec la perte de fonction de l'élément B2G engendrée par la même mutation. Par contre, malgré le fait que hnRNP

F et H ne lient pas les oligos d'ARN mutés dans les séries de G, une légère activité de l'élément B2G est tout de même observée lorsque ces mutations sont présentes. Une hypothèse serait qu'un ou plusieurs autres facteurs seraient en mesure de lier l'élément B2G malgré la présence des mutations des séries de G et participer à l'activité de cet élément.

Nous pouvons donc penser que, en plus des protéines hnRNP F et hnRNP H, l'élément B2G pourrait aussi être lié par d'autres facteurs d'épissage qui pourraient soit bloquer la liaison des protéines hnRNP F et H par encombrement stérique, agir comme répresseur de l'utilisation de ce site d'épissage ou au contraire activer l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-x_s. La protéine hnRNP A1 aurait été susceptible de lier cet élément étant donné son effet sur l'épissage de Bcl-x et son site de haute affinité similaire aux séquences retrouvées dans B2G. Nous avons cependant montré que cette protéine n'interagit pas à la séquence riche en G de B2G et que son effet serait donc médié par une autre région du pré-ARNm. Parmi les autres protéines susceptibles de pouvoir lier cet élément, nous pourrions retrouver la protéine hnRNP 2H9 et H' qui font partie de la même famille que les protéines hnRNP F et H et qui sont déjà connues comme liant des séquences riches en G (Caputi et Zahler, 2001). Les protéines SR ASF/SF2 et SC35, bien connues comme activateurs d'épissage (Black, 2003; Chabot, 1996; Graveley, 2000), sont deux autres protéines qui pourraient lier B2G. Une étude montre en effet que ces deux protéines SR peuvent lier des séquences riches en G sur le pré-ARNm de la β -tropomyosine (Expert-Bezancon et al., 2004). Afin de vérifier si une de ces protéines ou encore d'autres protéines sont

en mesure de lier l'élément B2G, il serait intéressant de procéder à l'identification de facteurs retenus par une colonne d'affinité faite avec l'oligo d'ARN B2G et sur laquelle un extrait nucléaire de cellules HeLa serait passé. Il serait aussi intéressant de faire cette expérience avec des extraits nucléaires et S100 (ne contenant pas de protéines SR) de plusieurs types cellulaires ainsi qu'avec des extraits de cellules en apoptose puisqu'il est connu que la localisation (nucléaire ou cytoplasmique) ainsi que l'expression des protéines hnRNP F et H peut différer selon le type cellulaire ou l'état de la cellule (cancéreuse ou normale par exemple) (Honore et al., 2004). Il est aussi connu que l'affinité des protéines hnRNP F et H pour certains sites de liaison peut changer selon le type cellulaire (Caputi et Zahler, 2001; Min et al., 1995). De plus, une étude montre que le profil de phosphorylation de la protéine hnRNP H change lors de l'induction de l'apoptose par l'acide rétinoïque chez les cellules HL-60 (Navakauskiene et al., 2004). Cette modification de la protéine pourrait affecter l'activité ou encore la localisation de cette protéine dans la cellule et, par conséquent, affecter l'épissage de Bcl-x.

Les protéines hnRNP F et hnRNP H modulent l'épissage de Bcl-x in vitro via la région B2G.

En accord avec le fait que B2G puisse lier les protéines hnRNP F et H, nous avons montré, que l'ajout de l'une ou l'autre de ces protéines permet de moduler l'épissage *in vitro* de Bcl-x en favorisant la quantité de Bcl-x_S produit. Ce résultat corrèle avec

celui obtenu lorsque la région B2G est supprimée ou mutée et qu'ainsi une augmentation dans la formation de l'isoforme Bcl-x_L est observée. Nous avons aussi montré, en utilisant la protéine hnRNP A1, que l'effet obtenu avec les protéines hnRNP F et H n'était pas causé par un effet général des protéines hnRNP qui, comme mentionné précédemment, ont généralement tendance à favoriser l'utilisation des sites d'épissage distaux (Mayeda et Krainer, 1992; Yang et al., 1994). De plus, nos résultats montrent que l'effet observé avec les protéines hnRNP F et H n'est probablement pas dû à des contaminants présents puisque l'ajout d'une préparation de his-SRp30c, exprimée dans le même type cellulaire et purifiée sur le même type de colonne, à la réaction d'épissage *in vitro* provoque l'effet contraire et favorise la formation de Bcl-x_L. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'effet de la protéine hnRNP F est médié par la région B2G. En effet, l'ajout de cette protéine à une réaction d'épissage *in vitro* fait avec un transcrit dépourvu ayant la région B2G mutée ne permet pas d'augmenter la quantité de Bcl-x_S formé. L'effet de la protéine hnRNP H est probablement aussi médié par cette région étant donné sa grande affinité pour la séquence riche en G retrouvé dans la région B2. L'action de la protéine hnRNP F se ferait donc via l'élément B2G et plus précisément, via les séries de G contenues dans cet élément.

Bien que les protéines hnRNP F et H lient les éléments riches en G et modulent l'épissage de Bcl-x *in vitro*, nous n'avons pour l'instant aucun indice du mécanisme d'action du complexe B2G / hnRNP F/H. Étant donné la proximité de l'élément B2G du site d'épissage 5' de Bcl-x_S, une hypothèse plausible serait que les protéines

hnRNP F et H stabilisent le snRNP U1 à ce site d'épissage. Des études, effectuées sur le pré-ARNm du gène *env* du VIH-1, démontrent que hnRNP H peut agir de la sorte en stabilisant le snRNP U1 au site d'épissage 5' de l'exon 6D (Caputi et Zahler, 2002). D'autre part, comme ces protéines possèdent un domaine riche en glycines leur permettant d'interagir entre eux ou avec d'autres protéines hnRNP, il serait possible que les protéines hnRNP F et H liées à B2G puissent agir selon le modèle de «looping out» suggéré pour une autre protéine possédant aussi un domaine riche en glycines, soit hnRNP A1 (Nasim et al., 2002). Selon cette hypothèse, les protéines hnRNP F ou H liées à l'élément B2G pourraient interagir, via leur domaine riche en glycines, avec une molécule identique ou une autre hnRNP liée dans l'intron et, en formant une boucle, permettre l'exclusion du site d'épissage 5' de *Bcl-x_L*. De plus, aucun indice ne nous permet de savoir si hnRNP F et H agissent indépendamment ou conjointement sur l'élément B2G. La régulation de l'exon alternatif N1 du gène *c-src* est un exemple bien connu où ces deux protéines doivent agir conjointement pour moduler l'épissage. Le pré-ARNm de *c-src* possède une région régulatrice (nommée DCS) située en aval du site d'épissage 5' de l'exon N1 qui doit recruter hnRNP F et hnRNP H afin d'activer l'inclusion de cet exon (Chou et al., 1999; Min et al., 1995).

La région B2.2 située en aval de B2G permet aussi une modulation de l'épissage de Bcl-x.

En plus de B2G, la région située en aval de cet élément semble aussi contribuer à l'effet de B2. En effet, une légère diminution du niveau de Bcl-x_S est observée lorsqu'il y a délétion de cette séquence (région B2.2). Nous ne nous sommes pas attardés sur cette région dans cette étude étant donné l'effet moins important de sa délétion sur l'épissage de Bcl-x que la délétion de la région B2G. Cependant, nous savons que cette région B2.2 contient une séquence riche en pyrimidines nommée CRCE2 décrite récemment (Massiello et al., 2004). Cette équipe a démontré que lorsque cette région est mutée, une augmentation de la formation de l'isoforme Bcl-x_S était observée chez les cellules A549, suggérant que cet élément réprimerait la formation de l'isoforme Bcl-x_S. Ce résultat obtenu dans les cellules A549 est contraire à ce que nous avons observé dans un extrait nucléaire de cellules HeLa. Ces deux résultats opposés peuvent laisser penser que cette région pourrait recruter différents facteurs, dépendamment du type de cellules, pouvant avoir des activités différentes sur la sélection des sites d'épissage 5' de Bcl-x. Des modifications post-traductionnelles différentes apportées à un même facteur liant cette séquence pourrait aussi être la cause de la divergence entre les deux résultats. En plus de l'élément CRCE2, cette région B2.2 contient une région riche en G (GGCGGGG) située immédiatement après la série de pyrimidines. Cette séquence, se trouvant à 25 nt de l'élément B2G, pourrait peut-être jouer un rôle dans l'activité de B2.2 et, comme il s'agit d'une séquence riche en G, agir en recrutant ou en renforçant la liaison des protéines hnRNP F et H dans la région B2. Cette séquence pourrait aussi recruter une autre protéine pouvant lier des séquences riches en G comme ceux mentionnées précédemment. Comme pour l'élément B2G, une colonne d'affinité effectuée avec un

oligo d'ARN contenant la séquence ou différentes parties de séquences de la région B2.2 pourrait permettre de connaître les facteurs liant cette région. Il serait particulièrement intéressant de comparer les facteurs recueillis avec les extraits nucléaires de cellules HeLa et de cellules A549 afin de connaître la cause provoquant la différence dans les résultats obtenus.

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche Dr Benoît Chabot pour son support et ses conseils apportés tout au long de ce projet ainsi que pour avoir corrigé ce mémoire. Je voudrais aussi remercier Dr Éric Massé ainsi que Dr Brendan Bell pour avoir accepté de corriger ce mémoire.

Je remercie Timothée Revil pour les nombreuses discussions au sujet de Bcl-x, pour ses suggestions pour ce mémoire ainsi que pour la photo de Bcl-x endogène chez les cellules HeLa. Un merci à Jean-François Fisette pour la purification des protéines his-hnRNP F et H ainsi qu'à Johanne Toutant pour la production de protéines recombinantes et d'extraits nucléaires. Merci à Caroline Paradis pour m'avoir fourni du his-SRp30c purifié. Merci à Stephen Hutchison, Annie Leroux et Aline Simoneau pour avoir débuté ce projet en construisant le mini-gène initial utilisé dans mon projet ainsi que pour les essais préliminaires effectués sur Bcl-x. Un merci aussi à tous les autres membres du laboratoire, présents ou anciens, pour leurs conseils et leur aide ainsi qu'aux membres du département. Un dernier remerciement à Sylvie Côté pour ses corrections et ses conseils apportés pour ce mémoire.

Références

Akgul, C., Moulding, D. A., et Edwards, S. W. (2004). Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 61, 2189-2199.

Ares, M., Jr., et Weiser, B. (1995). Rearrangement of snRNA structure during assembly and function of the spliceosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50, 131-159.

Arhin, G. K., Boots, M., Bagga, P. S., Milcarek, C., et Wilusz, J. (2002). Downstream sequence elements with different affinities for the hnRNP H/H' protein influence the processing efficiency of mammalian polyadenylation signals. *Nucleic Acids Res* 30, 1842-1850.

Baralle, M., Baralle, D., De Conti, L., Mattocks, C., Whittaker, J., Knezevich, A., Ffrench-Constant, C., et Baralle, F. E. (2003). Identification of a mutation that perturbs NF1 agene splicing using genomic DNA samples and a minigene assay. *J Med Genet* 40, 220-222.

Berglund, J. A., Abovich, N., et Rosbash, M. (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev* 12, 858-867.

Berglund, J. A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., et Rosbash, M. (1997). The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* 89, 781-787.

Black, D. L. (1992). Activation of c-src neuron-specific splicing by an unusual RNA element in vivo and in vitro. *Cell* 69, 795-807.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336.

Blanchette, M., et Chabot, B. (1997). A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. *Rna* 3, 405-419.

- Blanchette, M., et Chabot, B. (1999). Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *Embo J* 18, 1939-1952.
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., et Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Bourgeois, C. F., Popielarz, M., Hildwein, G., et Stevenin, J. (1999). Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation. *Mol Cell Biol* 19, 7347-7356.
- Braun, T., Dar, S., Vorobiov, D., Lindenboim, L., Dascal, N., et Stein, R. (2003). Expression of Bcl-x(S) in *Xenopus* oocytes induces BH3-dependent and caspase-dependent cytochrome c release and apoptosis. *Mol Cancer Res* 1, 186-194.
- Buratti, E., Baralle, M., De Conti, L., Baralle, D., Romano, M., Ayala, Y. M., et Baralle, F. E. (2004). hnRNP H binding at the 5' splice site correlates with the pathological effect of two intronic mutations in the NF-1 and TSHbeta genes. *Nucleic Acids Res* 32, 4224-4236.
- Buvoli, M., Cobianchi, F., Bestagno, M. G., Mangiarotti, A., Bassi, M. T., Biamonti, G., et Riva, S. (1990). Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. *Embo J* 9, 1229-1235.
- Buvoli, M., Cobianchi, F., Biamonti, G., et Riva, S. (1990). Recombinant hnRNP protein A1 and its N-terminal domain show preferential affinity for oligodeoxynucleotides homologous to intron/exon acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 18, 6595-6600.
- Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A. R., et Zahler, A. M. (1999). hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *Embo J* 18, 4060-4067.
- Caputi, M., et Zahler, A. M. (2001). Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *J Biol Chem* 276, 43850-43859.
- Caputi, M., et Zahler, A. M. (2002). SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D. *Embo J* 21, 845-855.

- Cartegni, L., Maconi, M., Morandi, E., Cobianchi, F., Riva, S., et Biamonti, G. (1996). hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol* 259, 337-348.
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., et Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 154, 2706-2713.
- Chabot, B. (1994). Synthesis and purification of RNA substrates, In RNA processing - a practical approach, S. J. H. e. B. D. Hames, ed. (Oxford, United Kingdom: IRL Press), pp. 1-29.
- Chabot, B. (1996). Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet* 12, 472-478.
- Chabot, B., Blanchette, M., Lapierre, I., et La Branche, H. (1997). An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol* 17, 1776-1786.
- Chalfant, C. E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B. J., Pettus, B. J., et Hannun, Y. A. (2001). FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 276, 44848-44855.
- Chalfant, C. E., Rathman, K., Pinkerman, R. L., Wood, R. E., Obeid, L. M., Ogretmen, B., et Hannun, Y. A. (2002). De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 277, 12587-12595.
- Chen, C. D., Kobayashi, R., et Helfman, D. M. (1999). Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene. *Genes Dev* 13, 593-606.
- Chou, M. Y., Rooke, N., Turck, C. W., et Black, D. L. (1999). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19, 69-77.
- Clarke, M. F., Apel, I. J., Benedict, M. A., Eipers, P. G., Sumantran, V., Gonzalez-Garcia, M., Doedens, M., Fukunaga, N., Davidson, B., Dick, J. E., et et al. (1995). A

recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11024-11028.

Cory, S., et Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Cory, S., Huang, D. C., et Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Côté, J., Dupuis, S., Jiang, Z., et Wu, J. Y. (2001). Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 938-943.

Côté, J., Dupuis, S., et Wu, J. Y. (2001). Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *J Biol Chem* 276, 8535-8543.

Côté, J., Simard, M. J., et Chabot, B. (1999). An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res* 27, 2529-2537.

Cramer, P., Caceres, J. F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A. F., Baralle, F. E., et Kornblihtt, A. R. (1999). Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 4, 251-258.

Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., et Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11456-11460.

Danial, N. N., et Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C. F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M. C., Stevenin, J., et Breathnach, R. (2000). The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol Cell Biol* 20, 6287-6299.

- Del Gatto-Konczak, F., Olive, M., Gesnel, M. C., et Breathnach, R. (1999). hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol Cell Biol* *19*, 251-260.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., et Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* *11*, 1475-1489.
- Ealovega, M. W., McGinnis, P. K., Sumantran, V. N., Clarke, M. F., et Wicha, M. S. (1996). bcl-xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice. *Cancer Res* *56*, 1965-1969.
- Expert-Bezancon, A., Sureau, A., Durosay, P., Salesse, R., Groeneveld, H., Lecaer, J. P., et Marie, J. (2004). hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B. *J Biol Chem* *279*, 38249-38259.
- Fang, W., Rivard, J. J., Mueller, D. L., et Behrens, T. W. (1994). Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes. *J Immunol* *153*, 4388-4398.
- Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P., et Valcarcel, J. (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* *6*, 1089-1098.
- Fridman, J. S., Benedict, M. A., et Maybaum, J. (1999). bcl-X(S)-induced cell death in 3T3 cells does not require or induce caspase activation. *Cancer Res* *59*, 5999-6004.
- Fu, X. D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna* *1*, 663-680.
- Giuliano, M., Bellavia, G., Lauricella, M., D'Anneo, A., Vassallo, B., Vento, R., et Tesoriere, G. (2004). Staurosporine-induced apoptosis in Chang liver cells is associated with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-XL. *Int J Mol Med* *13*, 565-571.
- Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballesteros, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L. H., Thompson, C. B., et Nunez, G. (1994). bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* *120*, 3033-3042.

Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* 6, 1197-1211.

Grillot, D. A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M. F., et Nunez, G. (1997). Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse *bcl-x* gene. *J Immunol* 158, 4750-4757.

Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Vila, M., Abbas, N., Perier, C., Faucheux, B. A., Vyas, S., et Hirsch, E. C. (2002). Increased expression and redistribution of the antiapoptotic molecule Bcl-xL in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 10, 28-32.

Honore, B., Baandrup, U., et Vorum, H. (2004). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. *Exp Cell Res* 294, 199-209.

Honore, B., Rasmussen, H. H., Vorum, H., Dejgaard, K., Liu, X., Gromov, P., Madsen, P., Gesser, B., Tommerup, N., et Celis, J. E. (1995). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes. *J Biol Chem* 270, 28780-28789.

Honore, B., Vorum, H., et Baandrup, U. (1999). hnRNPs H, H' and F behave differently with respect to posttranslational cleavage and subcellular localization. *FEBS Lett* 456, 274-280.

Horowitz, D. S., et Krainer, A. R. (1994). Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet* 10, 100-106.

Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N., et Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391.

Hutchison, S., LeBel, C., Blanchette, M., et Chabot, B. (2002). Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor. *J Biol Chem* 277, 29745-29752.

Jamison, S. F., Pasman, Z., Wang, J., Will, C., Luhrmann, R., Manley, J. L., et Garcia-Blanco, M. A. (1995). U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic Acids Res* 23, 3260-3267.

Jiang, Z. H., et Wu, J. Y. (1999). Alternative splicing and programmed cell death. *Proc Soc Exp Biol Med* 220, 64-72.

Jiang, Z. H., Zhang, W. J., Rao, Y., et Wu, J. Y. (1998). Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9155-9160.

Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R., et Shoemaker, D. D. (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302, 2141-2144.

Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M. A., et Manley, J. L. (1994). Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368, 119-124.

Krainer, A. R., Maniatis, T., Ruskin, B., et Green, M. R. (1984). Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. *Cell* 36, 993-1005.

Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J. I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., et Reed, J. C. (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 148, 1567-1576.

Lallena, M. J., Chalmers, K. J., Llamazares, S., Lamond, A. I., et Valcarcel, J. (2002). Splicing regulation at the second catalytic step by Sex-lethal involves 3' splice site recognition by SPF45. *Cell* 109, 285-296.

Le Guiner, C., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., et Del Gatto-Konczak, F. (2001). TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J Biol Chem* 276, 40638-40646.

Levy, J. B., Dorai, T., Wang, L. H., et Brugge, J. S. (1987). The structurally distinct form of pp60c-src detected in neuronal cells is encoded by a unique c-src mRNA. *Mol Cell Biol* 7, 4142-4145.

Lewis, B. P., Green, R. E., et Brenner, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 189-192.

- Lindenboim, L., Yuan, J., et Stein, R. (2000). Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells. *Oncogene* 19, 1783-1793.
- Logette, E., Wotawa, A., Solier, S., Desoche, L., Solary, E., et Corcos, L. (2003). The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene* 22, 935-946.
- Markovtsov, V., Nikolic, J. M., Goldman, J. A., Turck, C. W., Chou, M. Y., et Black, D. L. (2000). Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol* 20, 7463-7479.
- Martinez, R., Mathey-Prevot, B., Bernards, A., et Baltimore, D. (1987). Neuronal pp60c-src contains a six-amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart. *Science* 237, 411-415.
- Massiello, A., Salas, A., Pinkerman, R. L., Roddy, P., Roesser, J. R., et Chalfant, C. E. (2004). Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide. *J Biol Chem* 279, 15799-15804.
- Mayeda, A., et Krainer, A. R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68, 365-375.
- Mayeda, A., Munroe, S. H., Caceres, J. F., et Krainer, A. R. (1994). Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *Embo J* 13, 5483-5495.
- Mercatante, D. R., Bortner, C. D., Cidlowski, J. A., et Kole, R. (2001). Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *J Biol Chem* 276, 16411-16417.
- Mercatante, D. R., Mohler, J. L., et Kole, R. (2002). Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem* 277, 49374-49382.
- Mermoud, J. E., Cohen, P. T., et Lamond, A. I. (1994). Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *Embo J* 13, 5679-5688.

Merrill, B. M., Stone, K. L., Cobianchi, F., Wilson, S. H., et Williams, K. R. (1988). Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J Biol Chem* 263, 3307-3313.

Min, H., Chan, R. C., et Black, D. L. (1995). The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event. *Genes Dev* 9, 2659-2671.

Minn, A. J., Boise, L. H., et Thompson, C. B. (1996). Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J Biol Chem* 271, 6306-6312.

Mount, S. M., Pettersson, I., Hinterberger, M., Karmas, A., et Steitz, J. A. (1983). The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. *Cell* 33, 509-518.

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

Navakauskiene, R., Treigyte, G., Gineitis, A., et Magnusson, K. E. (2004). Identification of apoptotic tyrosine-phosphorylated proteins after etoposide or retinoic acid treatment. *Proteomics* 4, 1029-1041.

Nilsen, T. W. (1994). RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell* 78, 1-4.

Olopade, O. I., Adeyanju, M. O., Safa, A. R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C. B., et Recant, W. M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3, 230-237.

Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., et Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271, 15292-15297.

Pecci, A., Viegas, L. R., Baranao, J. L., et Beato, M. (2001). Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene. *J Biol Chem* 276, 21062-21069.

Pohlenz, J., Dumitrescu, A., Aumann, U., Koch, G., Melchior, R., Prawitt, D., et Refetoff, S. (2002). Congenital secondary hypothyroidism caused by exon skipping due to a homozygous donor splice site mutation in the TSHbeta-subunit gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 336-339.

Reeve, J. G., Xiong, J., Morgan, J., et Bleehen, N. M. (1996). Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance. *Br J Cancer* 73, 1193-1200.

Roberts, G. C., Gooding, C., Mak, H. Y., Proudfoot, N. J., et Smith, C. W. (1998). Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res* 26, 5568-5572.

Rosbash, M., et Seraphin, B. (1991). Who's on first? The U1 snRNP-5' splice site interaction and splicing. *Trends Biochem Sci* 16, 187-190.

Ryner, L. C., Goodwin, S. F., Castrillon, D. H., Anand, A., Vilella, A., Baker, B. S., Hall, J. C., Taylor, B. J., et Wasserman, S. A. (1996). Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the fruitless gene. *Cell* 87, 1079-1089.

Sampath, J., Long, P. R., Shepard, R. L., Xia, X., Devanarayan, V., Sandusky, G. E., Perry, W. L., 3rd, Dantzig, A. H., Williamson, M., Rolfe, M., et Moore, R. E. (2003). Human SPF45, a splicing factor, has limited expression in normal tissues, is overexpressed in many tumors, and can confer a multidrug-resistant phenotype to cells. *Am J Pathol* 163, 1781-1790.

Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., et Bertrand, R. (2004). Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation. *Oncogene* 23, 3915-3931.

Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J. E., et Zipursky, S. L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101, 671-684.

Schott, A. F., Apel, I. J., Nunez, G., et Clarke, M. F. (1995). Bcl-XL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 11, 1389-1394.

Selvakumar, M., et Helfman, D. M. (1999). Exonic splicing enhancers contribute to the use of both 3' and 5' splice site usage of rat beta-tropomyosin pre-mRNA. *Rna* 5, 378-394.

Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., et Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3100-3105.

Shiraiwa, N., Inohara, N., Okada, S., Yuzaki, M., Shoji, S., et Ohta, S. (1996). An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells. *J Biol Chem* *271*, 13258-13265.

Simard, M. J., et Chabot, B. (2002). SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization. *Mol Cell Biol* *22*, 4001-4010.

Stumm, G., Schlegel, J., Schafer, T., Wurz, C., Mennel, H. D., Krieg, J. C., et Vedder, H. (1999). Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *Faseb J* *13*, 1065-1072.

Sumantran, V. N., Ealovega, M. W., Nunez, G., Clarke, M. F., et Wicha, M. S. (1995). Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* *55*, 2507-2510.

Tange, T. O., Damgaard, C. K., Guth, S., Valcarcel, J., et Kjems, J. (2001). The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *Embo J* *20*, 5748-5758.

Taylor, J. K., Zhang, Q. Q., Monia, B. P., Marcusson, E. G., et Dean, N. M. (1999). Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. *Oncogene* *18*, 4495-4504.

Taylor, J. K., Zhang, Q. Q., Wyatt, J. R., et Dean, N. M. (1999). Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* *17*, 1097-1100.

Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S. F., et Anderson, P. (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* *67*, 629-639.

Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., *et al.* (1998). BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res* *58*, 256-262.

- Veraldi, K. L., Arhin, G. K., Martincic, K., Chung-Ganster, L. H., Wilusz, J., et Milcarek, C. (2001). hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells. *Mol Cell Biol* 21, 1228-1238.
- Villemaire, J., Dion, I., Elela, S. A., et Chabot, B. (2003). Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 278, 50031-50039.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., et Yuan, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78, 739-750.
- Wollerton, M. C., Gooding, C., Wagner, E. J., Garcia-Blanco, M. A., et Smith, C. W. (2004). Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13, 91-100.
- Wu, J. Y., et Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 1061-1070.
- Yang, X., Bani, M. R., Lu, S. J., Rowan, S., Ben-David, Y., et Chabot, B. (1994). The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6924-6928.
- Yang, X. F., Weber, G. F., et Cantor, H. (1997). A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity* 7, 629-639.
- Zahler, A. M., Damgaard, C. K., Kjems, J., et Caputi, M. (2004). SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing. *J Biol Chem* 279, 10077-10084.
- Zamore, P. D., et Green, M. R. (1989). Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9243-9247.
- Zamore, P. D., Patton, J. G., et Green, M. R. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature* 355, 609-614.

Zhu, J., Mayeda, A., et Krainer, A. R. (2001). Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell* 8, 1351-1361.