



L'axe RAS/PI3K renforce la sénescence cellulaire par la déstabilisation de ZNF768

Thèse

Romain Villot

Doctorat en médecine moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada



L'axe RAS/PI3K renforce la sénescence cellulaire par la déstabilisation de ZNF768.

Thèse de doctorat en médecine moléculaire

Philosophiae doctor (Ph. D.)

Romain Villot

Sous la direction de :

Mathieu Laplante, directeur de recherche

Steve Bilodeau, codirecteur de recherche

Québec, Canada

Résumé

RAS est une petite protéine Rho-GTPase à la tête d'un réseau de signalisation prolifératif important. Les sentiers activés par RAS incluent les Mitogen-Activated proteins Kinases (MAPK) et la voie Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) /Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR). Bien que de nombreuses évidences soutiennent une forte implication de RAS dans la carcinogenèse, les mécanismes moléculaires précis liant RAS et prolifération cellulaire ne sont pas tous élucidés. En utilisant des données publiques de phosphoprotéomique, notre équipe a identifié Zinc Finger Protein 768 (ZNF768) comme une nouvelle cible de RAS essentielle à la croissance et à la prolifération. ZNF768 est un facteur de transcription qui est déstabilisé au niveau post-traductionnel par les voies MAPK et mTOR/AKT. La déplétion aigue de ZNF768 induit prématurément une entrée en sénescence, un état caractérisé par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, et souvent mis en place en réponse au stress. Nos études montrent que ZNF768 est dégradée durant ce phénomène ainsi que durant la sénescence répllicative. De plus, la surexpression de ZNF768 réduit l'entrée en sénescence, via un mécanisme majoritairement dépendant du facteur de transcription p53, qui joue un rôle important dans la sénescence. ZNF768 affecte négativement la phosphorylation de certains résidus clés pour l'activation de p53 et inhibe son activité transcriptionnelle. Nous avons par ailleurs démontré une interaction physique entre ces deux protéines. L'ensemble de ces résultats suggère que les voies MAPK et mTOR, toutes deux activées par RAS, déstabilisent ZNF768 afin de renforcer la sénescence prématurée. De manière intéressante, les niveaux de ZNF768 sont élevés dans certaines tumeurs humaines. Ainsi, nous proposons un modèle dans lequel ZNF768 puisse favoriser la carcinogenèse en réduisant la sénescence et en favorisant la prolifération.

Abstract

RAS is a small Rho-GTPase protein that integrates growth factors signaling and activates several proliferating pathways including Mitogen-Activated Proteins Kinases (MAPK) and Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR). Although many evidence indicate that RAS is involve in carcinogenesis, the molecular mechanisms that link RAS to cellular proliferation are not well understood. By using phosphoproteomics data, our team identified Zinc Finger Protein 768 (ZNF768) as a new target of RAS signaling essential to growth and proliferation. ZNF768 is a transcription factor destabilized at the post-translational level by MAPK and mTOR/AKT. The acute depletion of ZNF768 induces senescence, a stable arrest of the cell cycle triggered by cellular stress. Our results show that ZNF768 is depleted during replicative and premature senescence. In addition, overexpression of ZNF768 bypasses senescence by a mechanism that is mainly dependent on the activity of p53, a transcription factor involved in senescence. Interestingly, ZNF768 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity by modulating its phosphorylation. Thus, MAPK and mTOR/AKT pathways destabilise ZNF768 to reinforce senescence. Moreover, ZNF768 levels are high in various human tumors. Altogether, these results suggest that ZNF768 promotes carcinogenesis by blocking senescence and by stimulating proliferation.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures et tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xviii
Avant-propos.....	xx
Introduction.....	1
1. Lorsque le chaos remplace l'ordre et la discipline : le cancer, ou le cheval de Troie d'une civilisation à l'espérance de vie croissante.	1
1.1. Prévalence du cancer dans notre société contemporaine.	1
1.2. Qu'est-ce que le cancer?	1
1.2.1. Notions d'histoire et d'étymologie.	1
1.2.2. Définition actuelle du cancer.	2
1.2.3. Quelles sont les facteurs favorisant le développement du cancer?	3
1.2.3.1. Les facteurs génétiques: syndrome du cancer héréditaire.....	4
1.2.3.2. Les facteurs environnementaux.	4
1.2.4. L'altération des mécanismes qui activent et/ou freinent la prolifération cellulaire est une grande caractéristique du cancer.	5
1.2.4.1. Les caractéristiques du cancer.....	5
1.2.4.2. Notions de voies de signalisation cellulaires, d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs. 5	
2. Les mécanismes généraux de promotion de la prolifération.....	6
2.1. Le cycle cellulaire, en quelques mots : notion de point de restriction.	7
2.2. Les complexes cyclines/CDKs : duos majeurs des transitions du cycle cellulaire.....	8

2.2.1.	Les kinases dépendantes des cyclines et leur régulation.....	8
2.2.2.	Les inhibiteurs de CDKs de types INK4 et CIP/KIP.	9
2.2.3.	Les cyclines.....	10
2.3.	Importance des facteurs de croissance dans le cycle cellulaire.	11
2.3.1.	Induction de la cycline D par les facteurs de croissance.....	11
2.3.2.	La phosphorylation du rétinoblastome pRB: le point de non-retour.	12
2.3.2.1.	Quelques généralités sur <i>RBI</i> , le premier gène suppresseur de tumeur identifié. 12	
2.3.2.2.	Interaction de pRB avec la famille de facteurs de transcription E2Fs.	13
2.3.2.3.	Remodelage de la chromatine par pRB.....	14
3.	Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire indépendants des facteurs de croissance.....	15
3.1.	La réponse aux dommages à l'ADN en quelques mots.	15
3.2.	La réponse précoce et la réponse tardive : un duel régit par l'intensité du signal.	16
3.3.	Le suppresseur de tumeur p53 : le « gardien du génome ».....	17
3.3.1.	Généralité.....	17
3.3.2.	Une brève histoire de la découverte de p53.....	18
3.3.2.1.	La piste initiale de l'oncogène.	18
3.3.2.2.	Un suppresseur de tumeur finalement ?.....	19
3.3.3.	Structure et régulation de p53.....	19
3.3.3.1.	Structure.....	19
3.3.3.2.	Régulation de la transcription par p53 : quel gène et quand ?	21
3.3.3.3.	Les grandes fonctions de p53.....	22
3.3.4	Mutations de p53 dans le cancer : de la délétion au gain de fonction.....	24
4.	Les voies de signalisation mitogéniques sous contrôle des facteurs de croissance : l'axe RAS/PI3K.	25
4.1.	Les protéines RAS.	25
4.1.1	La Découverte des protéines RAS et l'entrée dans l'ère des oncogènes.	25

4.1.2.	Les protéines RAS : des alternateurs biologiques.....	26
4.1.2.1.	La superfamille des protéines RAS.....	26
4.1.2.2.	La sous-famille des protéines RAS.....	27
4.2.	Voies de signalisation sous contrôle de RAS.....	28
4.2.1.	Principe d'activation générale de RAS par le biais d'un récepteur à tyrosine kinase (RTK). 28	
4.2.2.	La voie des MAPKs kinases.	29
4.2.2.1.	Généralité.....	29
4.2.2.2.	Principe d'activation général de la voie RAS/RAF/MEK/ERK.	30
4.2.2.3.	Importance de ERK1/2 dans la progression du cycle cellulaire.	30
4.2.3.	La voie de la phosphoinositide-3-kinase.....	31
4.2.3.1.	Généralités.	31
4.2.3.2.	La voie PI3K/AKT/mTOR, principe et activation.....	32
4.2.3.3.	Importance de la PI3K dans le contrôle du cycle cellulaire.....	34
4.2.4.	Incidence de la voie RAS/PI3K dans le cancer.....	35
5.	Arrêter de proliférer temporairement ou pour toujours, une règle ignorée des cellules cancéreuses.....	36
5.1.	Trois différents arrêts du cycle cellulaire.....	36
5.2.	La sénescence cellulaire.....	37
5.2.1.	Définition.	37
5.2.2.	Les grandes caractéristiques de la sénescence.	37
5.2.2.1.	Caractéristiques morphologiques.....	38
5.2.2.2.	Caractéristiques métaboliques et sécrétoires.....	38
5.2.2.3.	Caractéristiques transcriptionnelles, chromatinienne et structurales.....	39
5.2.2.4.	Inhibition de l'apoptose.	40
5.2.3.	Les différentes formes de sénescence.....	41
5.2.3.1.	La sénescence répliquative.....	41

5.2.3.2. La sénescence prématurée.....	42
5.2.4. Les mécanismes de contournement de la sénescence.....	44
5.2.5. La sénescence cellulaire dans la carcinogénèse, une épée à double tranchant.	45
5.2.6 Origines évolutives supposées de la sénescence cellulaire.....	46
6. Conclusion.....	47
Problématique et hypothèse de recherche.....	48
Objectifs spécifiques.....	49
CHAPITRE 1	50
ZNF768 LINKS ONCOGENIC RAS TO CELLULAR SENESCENCE	50
Résumé.....	51
Abstract.....	51
Introduction.....	52
Results.....	54
ZNF768 is a phosphoprotein destabilized upon RAS activation.....	54
ZNF768 depletion blocks proliferation and induces senescence-like features in cancer cells..	55
ZNF768 depletion affects the expression of key genes controlling proliferation and senescence.	56
.....	56
ZNF768 is degraded upon senescence entry.....	57
ZNF768 overexpression contributes to bypass RAS-induced senescence.....	58
ZNF768 interacts with and represses p53 activity	58
Elevated ZNF768 expression and protein levels in human cancers.....	60
Discussion	62
Material and Methods	66
Acknowledgments	73
Figures & Legends.....	74
Supplementary Figures & Legends.....	83

Bibliographie.....	93
CHAPITRE 2	96
Discussion générale.....	96
1. ZNF768, une protéine à doigts de zinc « pas comme les autres ».....	96
1.1 Résumé des principaux résultats.....	96
1.2 Identification de ZNF768 comme une cible potentielle de la voie RAS/PI3K.....	98
1.3. ZNF768 est une protéine à doigts de zinc.....	99
1.4. Le domaine CTD de ZNF768.....	100
1.4.1. Généralités sur le domaine CTD de RPB1.....	100
1.4.2. ZNF768 présente un domaine CTD partiellement conservé.....	101
2. ZNF768, un facteur de transcription au cœur de la signalisation des facteurs de croissance et du contrôle de la prolifération cellulaire.....	102
2.1 ZNF768 est négativement régulé au niveau post-traductionnel par la voie RAS/PI3K. ...	102
2.2 ZNF768 est un facteur de transcription de haute importance pour la prolifération cellulaire.....	103
2.2.1 La perte de ZNF768 affecte la prolifération et déclenche la sénescence cellulaire. ...	103
2.2.2 ZNF768 est un facteur de transcription important pour l'expression de gènes spécifiques du cycle cellulaire.	103
2.3 Les signaux de stress inducteurs de sénescence cellulaire entraînent une diminution de ZNF768.....	104
2.3.1 Les niveaux de ZNF768 sont diminués dans la sénescence répllicative et prématurée.....	104
2.3.2 Le stress génotoxique mobilise l'axe PI3K/AKT et le protéasome pour déclencher la dégradation de ZNF768.	105
3. ZNF768 diminue certains phénotypes associés à la sénescence.....	107
4. ZNF768, un adversaire de plus pour p53.....	107
4.1. ZNF768 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53.....	107

4.2.	ZNF768 interagit avec p53 et affecte son état de phosphorylation.....	108
4.3.	Hypothèses sur l'interaction fonctionnelle entre ZNF768 et p53.	108
5.	ZNF768 est surexprimé dans certains cancers, une piste thérapeutique?	111
6.	Importance de ZNF768 dans le cycle cellulaire : un rôle mitotique?	112
6.1.	Les niveaux de ZNF768 sont régulés par le cycle cellulaire et atteignent un minimum en mitose.	112
6.2.	ZNF768 interagit avec des composants protéiques du centromère et occupe possiblement ce compartiment.	114
7.	Hypothèses sur les origines évolutives de ZNF768.	115
	Conclusion	117
	Bibliographie.....	118

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1: Les phases du cycle cellulaire dépendantes des facteurs de croissance.	8
Figure 2: Cinétique d'expression des principaux complexes cycline-CDK dans les grandes phases du cycle cellulaire.	11
Figure 3: Régulation de la cycline D par les facteurs de croissance.	12
Figure 4: Structure protéique classique de la famille de protéines à poche pRB.	13
Figure 5: Domaines et structure de la protéine p53.	20
Figure 6: Cycle d'activation/inactivation des protéines GTPases.	27
Figure 7: L'axe RAS/PI3K.	29
Figure 8: La voie PI3K/AKT/mTOR.	34
Figure 9: Caractéristiques morphologiques des cellules sénescents.	38

Article

Figure 1: Identification of ZNF768 as a new phosphoprotein destabilized upon RAS activation. ...	74
Figure 2: ZNF768 depletion blocks proliferation and induces senescence-like features in cancer cells	76
Figure 3: ZNF768 depletion affects the expression of key genes controlling proliferation and senescence.	78
Figure 4: ZNF768 is depleted upon senescence entry and its overexpression contributes to bypass this process.	79
Figure 5: ZNF768 interacts with and represses p53 transcriptional activity.	80
Figure 6: ZNF768 expression and protein levels are elevated in several human cancers.	82
Figure S 1: Identification of ZNF768 as a new phosphoprotein destabilized upon RAS activation.	83
Figure S 2: ZNF768 depletion blocks proliferation and induces senescence-like features in cancer cells	85
Figure S 3: ZNF768 depletion affects the expression of key genes controlling proliferation and senescence.	87
Figure S 4: Doxorubicin-induced ZNF768 degradation is mediated by the PI3K pathway.	89
Figure S 5: ZNF768 interacts with and represses p53 transcriptional activity.	90
Figure S 6: ZNF768 expression and protein levels are elevated in several human cancers.	92
Table 1: List of primers used for qPCR.	70

Discussion

Figure 1: Mode d'action proposé de ZNF768.....	97
Figure 2: Motif consensus de phosphorylation retrouvés sur ZNF768.....	98
Figure 3: Les types de domaines les plus abondants chez les protéines à doigts de zinc.....	99
Figure 4: Phosphorylation de ZNF768.....	101
Figure 5: Induction de l'apoptose en réponse à la déplétion de ZNF768 selon le statut sauvage ou nul de p53.....	104
Figure 6: L'inhibition pharmacologique des MAPKs kinases (ERK1/2) prévient la dégradation de ZNF768 induite par le stress génotoxique.....	105
Figure 7: La diminution de ZNF768 induite par le stress génotoxique est proportionnelle à la dose de doxorubicine.....	106
Figure 8: ZNF768 interagit avec l'holoenzyme PP6.....	110
Figure 9: ZNF768 est dégradée en mitose par un mécanisme dépendant du protéasome.....	113
Figure 10: ZNF768 est enrichie au centromère.....	114

Liste des abréviations

A = Adénine

ADN = Acide désoxyribonucléique

AKT = RAC- α serine/threonine-protein kinase

AMPK = AMP-activated protein kinase

ANKRD28 = Ankyrin Repeat Domain 28

ANKRD44 = Ankyrin Repeat Domain 44

ANKRD52 = Ankyrin Repeat Domain 52

APC = Anaphase-Promoting-Complex

ARF = ADP Ribosylation Factor

Arg = Arginine

ARN = Acide ribonucléique

ARNm = Acide ribonucléique messenger

ATM = Ataxia-Telangiectasia-Mutated

ATP = Adénosine Triphosphate

ATR = Ataxia Telangiectasia and Rad3-related

AURK = Aurora kinase

BAK = BCL-2 homologous Antagonist/Killer

BAX = BCL2 Associated X

BBC3 = Bcl-2-Binding Component 3

BCL-2 = B-Cell Lymphoma 2

BMI1 = B cell-specific Moloney murine leukemia virus Integration site

BRCA1 = Breast Cancer 1

BRG1 = Brahma-Related Gene-1

BRIP1 = BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1

BTG2 = BTG anti-proliferation factor 2

CBP/P300 = CREB (cAMP-response-element-binding protein) -Binding Protein/P300

CDC25 = Cell Division Control protein 25

CDC6 = Cell Division Control protein 6

CDK = Cyclin-Dependent Kinase

CDKN1A = Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

CENP-E = Centromere-Associated Protein E

CHK1 = Checkpoint Kinase 1

CHK2 = Checkpoint Kinase 2
CHR = Cell cycle gene Homology Region
CIP/KIP = CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein
CIRC = Centre International de Recherche sur le Cancer
CSF = Colony Stimulating factor
CSF-1 = Macrophage Colony Stimulating Factor
CTD = C-Terminal Domain
Cys = Cystéine
DEC1 = Deleted in Esophageal Cancer 1
DNTM1 = DNA Methyltransferase 1
Dr = Docteur
DREAM = Dimerization partner, RB-like, E2F And Multi-vulval class B
DRP = Domaine Riche en Proline
DTAD = Domaines de Transactivation Transcriptionnelle
E2F = E2 Factor
EGF = Epidermal Growth Factor
EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor
EIF4E = Eukaryotic translation Initiation Factor 4E
ERK = Extracellular signal-Regulated Kinases
Ex = Exemple
EZH2 = Enhancer Of Zeste Homologue 2
FAS = Fas Cell Surface Death Receptor
FHAS = Foyers d'Hétérochromatines Associés à la Sénescence
GADD45A = Growth Arrest and DNA Damage inducible Alpha
GAP = GTPase-Activating Protein
GDP = Guanosine Di-Phosphate
GEF = Guanine-Exchanging-Factor
Glu = Glutamate
Gly = Glycine
GRB2 = Growth factor Receptor-Bound protein 2
GSK3- β = Glycogène Synthétase Kinase 3 bêta
GTP = Guanosine Triphosphate
H3K9me3 = Histones H3 lysine 9 triple méthylation
HDAC1 = Histone Désacétylase 1
His = Histidine

hTERT = human Telomerase Reverse Transcriptase
IGFBP = Insulin Growth Factor Binding Protein
IL6 = Interleukine 6
INK4 = Inhibiteur de CDK4
JMJD2C = Jumonji Domain 2C
JMJD3 = Jumonji Domain containing 3
JNK= c-Jun amino (N)-terminal Kinase
kDa = kilodalton
LIM = Lin-11, Isl-1 et Mec-3
LUAD = Lung Adenocarcinoma
LUSC = Lung Squamous cell Carcinoma
Lys = Lysine
MAP Kinases = Mitogen-Activating-Protein-Kinase
MAPKAP1 = Mitogen-Activated Protein Kinase-Associated Protein 1
MAT1 = CDK-activating kinase assembly factor MAT1
MDM2 = Murine Double Minute 2
me= méthylation
MEK = MAPK/ERK Kinase
mLST8 = Mammalian Lethal with SEC13 protein 8
mSIN1 = Mammalian Stress-activated protein kinase Interacting protein 1
mTOR = Mechanistic-Target Of Rapamcin
MYT1 = Membrane-associated Tyrosine- and Threonine- specific cdc2- inhibitory kinase
NCBI = National Center for Biotechnology Information
NDC80 = Nuclear Division Cycle 80
NTS = Nuclear Translocation Signal
p53RE = p53 Response Element
PAI1 = Plasminogen-Activator Inhibitor 1
PAR = Poly-ADP-Ribose
PARP = Poly-ADP-Ribose Polymerase
PATZ1 = POZ-, AT hook-, and Zinc finger-containing protein 1
PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR = Polymerase Chain Reaction
PDK1 = Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
-PH = Plescktrin Homology
Phase M = Phase de Mitose

Phase S = Phase de Synthèse
PHD = Plant Homeodomain
PI3K = Phosphoinositide-3-Kinase
PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3 = Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate
PKB = Protéine Kinase B
PLK1 = Polo Like Kinase 1
PMAIP1 = Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
PML = Promyelocytic Leukemia
Point R = Point de Restriction
Pol II = ARN Polymérase II
PP = Protein Phosphatase
PRAS40 = Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa
Pro = Proline
PSAS = Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence
PTEN = Phosphatase and Tensin homolog
Pu = Purine
Py = Pyrimidine
R = Restriction site (point de restriction)
RAB = Ras-Associated Binding
RAF = Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAN = Ras-related Nuclear protein
RAPTOR = Regulatory-Associated Protein of mTOR
RAS = Rat Associated Sarcome
RB1 = Rétinoblastome
RBL1 = RB transcriptional corepressor Like 1
RBL2 = RB transcriptional corepressor Like 1
RCPG = Récepteurs Couplés aux Protéines G
Rheb = Ras Homolog Enriched in Brain
RHO = Ras Homologous
RICTOR = RPTOR Independent Companion of mTOR complex 2
RING = Really Interesting New Gene
RSK = p90 Ribosomal S6 Kinase
SCF = Skp1-Cul1-F-box-protein
Ser = Sérine

SERCA = Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
SFN = Stratifin
SgoI = Shugoshin
SH2 = Src-Homology 2
SM = Spectrométrie de Masse
SOD = Superoxyde Dismutase
SOS = Son Of Sevenless
SUV39H1 = Histone-lysine N-methyltransferase
SV40 = Simian Virus 40
SWI/SNF = Switch/Sucrose Non-Fermentable
T = Thymidine
TAD = Transactivation Domaine
TGF = Transforming Growth Factor
Thr = Thréonine
TIGAR = TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase
TNF = Tumor Necrosis Factor
TSC1/2 = Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2
TSS = Transcription Start Site
Tyr = Tyrosine
ULK1 = Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
ULK2 = Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 2
VEGF =Vascular Endothelial Growth Factor
V-RAS = Virus-Rat-Sarcoma
V-SRC = Virus – Sarcoma
WEE1 = Wee1-like protein kinase
γH2Ax = Gamma H2Ax
Zn = Zinc
ZNF768 = Zinc Finger 768

« *Rien n'a de sens en biologie si ce n'est à la lumière de l'évolution* » **Theodosius Dobzhansky**

Remerciements

Il m'est important de prendre un moment pour de sincères remerciements envers les personnes ayant contribué à ce travail qui représente l'aboutissement de plusieurs années d'investissement. J'ai eu la chance durant mon doctorat et mon parcours en général, de rencontrer de nombreuses personnes intéressantes et motivantes qui n'ont fait qu'appuyer ma volonté d'évoluer dans ce milieu formidable qu'est la recherche scientifique. Je pense à tous mes enseignants, directeurs de recherche et encadrants de stage en tout genre, sans oublier mes nombreux collègues de laboratoire et d'amphithéâtre. Ce parcours universitaire dans la science m'a amené jusqu'à cette belle région qu'est le Québec, où j'y ai effectué ces années de doctorat dans un environnement scientifique des plus stimulants.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Mathieu Laplante, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir permis de prendre en charge un projet scientifique aussi passionnant. Je suis très fier d'avoir été recruté pour travailler sur cette nouvelle protéine dont l'existence était à peine connue lors de mon arrivée. Je remercie le Docteur Laplante pour le cadre exemplaire dont j'ai bénéficié, son optimisme sans égal lors des périodes difficiles, et ses efforts pour transmettre les bonnes compétences et connaissances requises dans le monde de la recherche. Je pense aux innombrables discussions, sans oublier les divers rebondissements qui ont orienté ce projet. Je remercie Mathieu Laplante pour l'autonomie et la confiance dont j'ai bénéficié durant mon doctorat ainsi que l'intérêt avec lequel il a toujours considéré mes idées. J'étais très motivé à devenir un jour chercheur lors de mon arrivée en doctorat, je le suis d'autant plus aujourd'hui.

Je remercie beaucoup mon co-directeur, Steve Bilodeau, pour l'accueil dans son laboratoire lors de certaines expérimentations, ainsi que pour les précieux conseils fournis durant ces années, notamment en ce qui concerne les questions transcriptionnelles. Je suis par ailleurs très reconnaissant envers les Docteurs Frédérick Antoine Malette, Sabine Elowe et Jean-yves Masson ainsi que leurs équipes respectives pour tout le travail effectué dans ce projet, avec une mention spéciale à Erlinda et Karine ainsi qu'à mon bon ami Luciano que je suis tellement heureux d'avoir rencontré à Québec.

Je tiens à remercier chaleureusement Yves Gélinas, pour son professionnalisme exemplaire et son accompagnement durant toutes ces années. Il est impossible d'oublier sa joie de vivre et les incalculables parties de rigolades au laboratoire. Yves, ta présence dans l'équipe est très importante.

Je remercie l'ensemble des collègues et amis de mon équipe, Mathilde, Manal, Nolwenn, Charles et Laura, sans oublier les anciens, Blandine et Christian, avec une mention spéciale à Audrey pour son optimisme et tout le travail conséquent fourni dans ce projet, ainsi qu'à mon pote Romain,

pour les bons moments passés, les discussions passionnantes autour de ce fameux ZNF768, ainsi que l'aide précieuse apportée entre autres dans l'utilisation de certains outils bio-informatiques.

Je remercie mes autres collègues, étudiants, postdoctorants ou professionnels de recherches, Morgan, Julien, Déborah, Sandrine, Stéphanie, Elizabeth, ainsi que les anciens, Kévin et Damien, avec qui j'ai partagé de très bons moments au laboratoire. À ce titre, je ne peux oublier de remercier mes bonnes copines et collègues, Sandra et Justine. Évidemment, nombreuses sont les personnes que j'ai croisé durant ces années, à l'université, au laboratoire, en congrès, ou complètement en dehors de la science. La liste est exhaustive mais j'ai envie de remercier mes « chums » du Québec, Charles et Sam, pour leur inclusivité et les excellents moments passés sur un fond de bon hip hop, ou autour d'un repas de Noël à base de Caribou. Je pense aussi à mes précieux amis de longues dates, Dylan et Nicolas, qui m'ont vu évoluer dans ma passion pour la biologie et sur qui je pourrai toujours compter, réciproquement.

Au-delà des amis et scientifiques qui m'entourent, il est des plus important pour moi de prendre le temps pour remercier ma famille, qui malgré l'éloignement et ma disponibilité quasi nulle, n'a jamais cessée de m'apporter le soutien le plus précieux que l'on puisse avoir. Je remercie tout d'abord mes parents, pour m'avoir amené là où j'en suis aujourd'hui en cultivant l'amour du savoir et de la science depuis mon plus jeune âge. Je remercie chaleureusement mes frères. Le premier, Guillaume, un super grand frère avec qui je partage bien des passions, toujours disponible (le travail de nuit, c'est parfait avec le décalage horaire), et que j'espère voir un jour en visite au Québec malgré son attachement pour notre Bretagne natale. Le deuxième, Sylvain, scientifique à ces œuvres, qui partage avec moi cet amour pour la science, et avec qui les discussions peuvent ressembler à du langage codé lorsque les mots PCR et CRISPR s'invitent en repas de famille. Je n'ai aucun doute sur sa réussite dans le monde de la biologie végétale. Je ne peux remercier tous les membres de ma nombreuse famille, mais je me dois de souligner le soutien reçu par mes deux grands-mères, qui n'ont jamais cessé de m'écrire durant ces nombreuses années, malgré mes changements d'adresse incessants. Aussi, c'est avec émotion que je pense à mon grand-père paternel, qui était tellement passionné de sciences, et avec qui j'aurai été si fier de partager mes expériences.

Enfin, parce que toutes les bonnes choses ont une fin, je termine ici en remerciant ma conjointe et collègue, Giada, que la science a mis sur mon chemin à Québec, et à qui je dois tant de bonheur et de soutien.

Merci à vous et vive la science!

Avant-propos

L'œuvre ici présente est une thèse de doctorat produite pour l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor (Ph.D.) à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval. Le corps principal de cette thèse se compose d'un chapitre unique, élaboré à partir d'un article scientifique rédigé en anglais et portant sur l'étude d'une nouvelle protéine : Zinc Finger 768 (ZNF768).

Article de la thèse :

Villot, R., Poirier, A., Bakan, I., Boulay, K., Fernández, E., Devillers, R., Gama-Braga, L., Gagné, A., Bérubé, J.S., Bérubé, J.C., Coulombe, Y., Orain, M., Gélinas, Y., Gobeil, S., Bossé, Y., Masson, J.Y., Elowe, S., Bilodeau, S., Manem, V., Joubert, P., Mallette, F.A & Laplante, M. 2020. ZNF768 links oncogenic RAS to cellular senescence. En révision au journal *Nature Communications*.

Cet article, dont je suis le premier auteur, dévoile les résultats les plus pertinents accumulés durant mon doctorat sur cette nouvelle protéine et sur ses liens avec la voie oncogénique RAS/PI3K, la sénescence cellulaire et le cancer. Il a été soumis au journal *Nature Communications* le 9 mars 2020 et accepté pour une révision par un comité de pairs le 23 mars 2020. La version présentée ici contient les résultats et les figures ajoutées à ce travail en réponse aux commentaires et aux attentes du comité de pairs en vue d'une publication dans *Nature Communications*. L'intégralité de ce projet a été dirigé par le Dr. Laplante et ma contribution a été très importante dans son ensemble, que ce soit pour la conceptualisation et la réalisation des expériences, que pour l'interprétation des données scientifiques et de leur impact sur la tournure du projet.

Il est important de mentionner que ce projet a débuté alors même qu'aucune documentation spécifique n'était disponible sur cette nouvelle protéine. Ainsi, beaucoup de pistes ont pu être explorées durant mon doctorat sans que celles-ci ne puissent être présentées dans un même article ou faire office d'une publication à part entière. Certains de ces résultats ont alors été insérés dans la partie « discussion générale » de cette présente thèse.

Introduction

1. Lorsque le chaos remplace l'ordre et la discipline : le cancer, ou le cheval de Troie d'une civilisation à l'espérance de vie croissante.

Au sein de notre société contemporaine, le mot « cancer » raisonne comme une malédiction. Malgré les extraordinaires avancées scientifiques accomplies à ce jour, le cancer reste une maladie invaincue, et une véritable épée de Damoclès flottant au-dessus de chacun de nous. On estime qu'une personne sur deux sera victime d'un cancer au cours de sa vie, et que tout individu connaît dans son entourage une personne atteinte de cette maladie. Le 11 mai 1971, Le président Nixon lui-même avait déclaré que le cancer était « l'un des ennemis les plus meurtriers » et « insaisissables de l'humanité » (Le Monde, 13 mai 1971). Celui-ci avait alors lancé un « programme de lutte contre le cancer » d'un budget de 332 millions de dollars dans le but d'éradiquer cette maladie (Le Monde, 13 mai 1971). Une idée louable mais naïve, qui faisait abstraction du caractère extrêmement complexe et hétérogène du cancer. Presque 50 ans plus tard, le cancer est loin d'être éradiqué.

1.1. *Prévalence du cancer dans notre société contemporaine.*

Au Canada, le cancer est responsable d'environ 30% des décès. (Société Canadienne du Cancer, 2020). Les cancers du poumon, du sein, de la prostate et du colon représentent près de la moitié de tous les cancers diagnostiqués, avec une forte prévalence du cancer de la prostate chez l'homme, et du sein chez la femme (Société Canadienne du Cancer, 2020). Le taux de survie post-diagnostic après 5 ans est actuellement estimé à 63%, avec des variations considérables selon les différents types de cancers (93% pour le cancer de la prostate contre 19% pour le cancer du poumon) (Société Canadienne du Cancer, 2020). L'incidence du cancer varie selon les territoires, mais il affecte toutes les sociétés à travers le monde. De plus, cette maladie est susceptible de survenir à tout âge, bien que les personnes de plus de 50 ans soient les plus à risque (Société Canadienne du Cancer, 2020). La probabilité de développer cette maladie augmente considérablement avec l'âge car le cancer est la résultante d'aberrations génétiques accumulées successivement au cours de la vie. Ainsi, avec l'espérance de vie en constante augmentation, il est logique de supposer que l'incidence du cancer ne fera qu'augmenter avec le temps, tout en réduisant l'espérance de vie en bonne santé.

1.2 *Qu'est-ce que le cancer?*

1.2.1. *Notions d'histoire et d'étymologie.*

L'histoire nous montre que l'Homme moderne est tourmenté par le cancer depuis plusieurs millénaires. La plus ancienne trace écrite qui en fait référence apparaît dans un manuscrit Égyptien

daté de 1500 à 1600 ans avant Jésus Christ (J.-C) (Faguet, 2015). Dans ce papyrus, figure la description de renflements aux niveaux de la poitrine, ce qui est perçu comme la première référence connue du cancer du sein. Il est aussi mentionné que lorsque ces renflements s'étalent au-delà du sein, aucune guérison n'est possible (Faguet, 2015). Le caractère invasif et impitoyable du cancer était donc connu depuis l'Égypte ancienne. C'est ensuite en Grèce antique que le terme latin « cancer », dérivé du Grec « Karkinos » signifiant « écrevisse », sera utilisé en référence à l'étalement de certains cancers du sein sur la poitrine, et pouvant ressembler à des pattes de crabes. Dans le fameux Corpus hippocratique, le mot « Karkinos » était utilisé pour désigner les maladies produisant des amas et des renflements suspects (Faguet, 2015). À cette époque, la médecine reposait sur la théorie des humeurs, une doctrine selon laquelle le corps humain est composé de quatre éléments fondamentaux, toute maladie étant considérée comme un déséquilibre dans ces principaux constituants. Ce concept sera utilisé quelques siècles plus tard par le médecin Grec Claude Galien (Galen), qui proposera que la formation des tumeurs est due à l'infiltration anormale de l'un de ces éléments, la supposée bile noire (Faguet, 2015). Cette doctrine sera plus ou moins dominante durant 15 siècles, jusqu'à ce que la découverte de la circulation sanguine par William Harvey (1578 – 1657), et de la lymphe par Gaspare Aselli (1581 – 1626), mette fin aux croyances de la bile noire (Faguet, 2015). Enfin, c'est en s'appuyant sur la découverte de la cellule par Robert Hooke (1635 - 1703) en 1665, puis de la théorie cellulaire de Theodor Schwann (1810 - 1882), selon laquelle les animaux sont composés de cellules, que le pathologiste Rudolph Virchow (1821 – 1902) proposa pour la première fois que le cancer se développe à partir d'une cellule modifiée (Faguet, 2015; Walter et Scott, 2017). Pour Virchow, « le corps est un état cellulaire dans lequel chaque cellule est un citoyen », et on lui attribue la phrase « *omnis cellula e cellula* », signifiant que toute cellule dérive d'une autre cellule (Faguet, 2015; Walter et Scott, 2017). Cette théorie fut ensuite améliorée par Theodore Boveri (1862 – 1915) qui proposa pour la première fois le concept de mutations somatiques dans le développement du cancer (Faguet, 2015).

1.2.2. Définition actuelle du cancer.

Les exploits techniques en biologie moléculaire effectués ces dernières décennies ont permis d'apporter une meilleure compréhension de la biologie du cancer, de ses caractéristiques, et des étapes cruciales à son développement. On définit aujourd'hui le cancer comme un ensemble de maladies causées par la prolifération incontrôlée de cellules « transformées » à la suite d'une accumulation de mutations génétiques successives, aboutissant à la formation de tumeurs cancéreuses (définition libre inspirée de (Morgan, 2007 ; Société Canadienne du Cancer, 2020 ; American Cancer Society, 2020)). Les tumeurs peuvent être non cancéreuses lorsqu'elles restent localisées (tumeurs primitives) et

cancéreuses ou maligne lorsqu'elles se mettent à envahir l'organisme au complet. On parle dans ce cas de métastases (Société Canadienne du Cancer, 2020). Il est important de préciser que le mot « cancer » est finalement un terme très générique pour désigner un ensemble de maladies apparentées avec des caractéristiques très spécifiques, selon le type de cellules ou de tissus d'origine (Morgan, 2007). Chaque cancer est tout d'abord spécifié par son origine tissulaire initiale. Si un cancer du poumon s'étend au cerveau, on parlera de cancer du poumon avec métastases au cerveau (Société Canadienne du Cancer, 2020).

On distingue quatre grandes catégories de cancers : les cancers solides, liquides, métastatiques ou secondaires (Fondation contre le cancer, 2020 ; Morgan, 2007). Dans les cancers solides (1), les carcinomes sont des cancers qui dérivent de l'épithélium, c'est à dire la couche de cellule qui tapissent la surface de nos organes (peau, intestin, poumons). Les adénocarcinomes étant des carcinomes avec une origine glandulaire. On appelle sarcome les cancers des tissus conjonctifs (tissus de soutien) comme les os, le cartilage et les muscles. Les carcinomes sont de loin les plus fréquents car ils comptent pour environ 90% des cancers humains et ils peuvent se développer à partir de n'importe quel tissu. Les cancers liquides ou sanguins (2) sont des cancers de cellules hématopoïétiques du sang (leucémie) et du système lymphatique (lymphome). À partir du moment où un cancer s'étend au-delà de son tissu d'origine, on parle de cancer disséminé ou métastatique (3). Enfin, il arrive qu'un traitement mis en place pour lutter contre un cancer initial puisse provoquer l'apparition d'un autre cancer dont l'origine est différente du premier, dans ce cas, on parle de cancer secondaire (4) (Morgan, 2007; Fondation contre le cancer, 2020 ; Société Canadienne du Cancer, 2020 ; American Cancer Society, 2020).

1.2.3. Quelles sont les facteurs favorisant le développement du cancer?

Vers la fin des années 1800, il était pensé que le cancer pouvait être le fruit d'une irritation chronique ou d'une infection virale, ce qui est encore considéré valide aujourd'hui (Blackadar, 2016). Cependant, il fut constaté au cours du 20e siècle que les types de cancers variaient considérablement à travers les différentes régions du monde, et que les personnes qui migraient d'un pays à l'autre développaient généralement des cancers communs à leur région d'accueil et non pas de leur région d'origine (Blackadar, 2016). En partant de ce constat, il fut conclu que le cancer était causé par l'exposition à certains environnements plutôt qu'à un bagage génétique héréditaire, d'où la création du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 1965, qui a pour objectif de mener des études épidémiologiques et expérimentales sur les causes de cancers humains (Blackadar, 2016). Aujourd'hui, on sait qu'une petite proportion de cancers peut tout de même être attribuée à l'hérédité (voir partie 1.2.3.1).

1.2.3.1. Les facteurs génétiques: syndrome du cancer héréditaire.

Certains cancers sont dits héréditaires, dans le cas où une personne à un risque élevé de le développer à un âge relativement jeune, en raison d'une ou plusieurs anomalies génétiques (Rahner et Steinke, 2008). Il est estimé qu'environ 5 à 10% de l'ensemble des cancers ont une telle origine (Rahner et Steinke, 2008). En général, un cancer héréditaire est dû à une mutation dans un seul gène (maladie héréditaire monogénique), qui bien souvent est impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN et/ou dans le contrôle de la prolifération (Rahner et Steinke, 2008). Par exemple, les mutations germinales dans le gène *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) sont associées à un risque très élevé de cancer du sein de 60 à 80% (Christou et Kyriacou, 2012; Rahner et Steinke, 2008). *BRCA1* est un gène suppresseur de tumeur identifié en 1994 qui joue un rôle important dans la réparation des dommages à l'ADN (Christou et Kyriacou, 2012). L'incidence des mutations germinales dans *BRCA1* est estimée entre 1/500 à 1/1000 (Rahner et Steinke, 2008). Le rétinoblastome familial est un autre exemple de cancer héréditaire. Il s'agit d'une tumeur rare de la rétine qui touche principalement des jeunes enfants (Berry et al., 2019). Le gène *RBI* (*RB transcriptional corepressor 1*) est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été découvert suite à l'observation que les patients souffrant du rétinoblastome portent bien souvent une délétion sur le long bras du chromosome 13 (Berry et al., 2019). Le gène *RBI* a été identifié et on sait aujourd'hui qu'il s'agit d'un des plus importants régulateurs de la prolifération cellulaire (voir partie 2.3.2) (Berry et al., 2019). L'incidence des mutations dans *RBI* est évaluée entre 1/15000 et 1/20000 (Rahner et Steinke, 2008). Il existe d'autres syndromes de cancers héréditaires ayant pour causes des mutations germinales affectant la stabilité du génome, tels que l'anémie de Fanconi et l'ataxie-télangiectasie (Nalepa et Clapp, 2018; Rahner et Steinke, 2008).

1.2.3.2. Les facteurs environnementaux.

Tel que mentionné précédemment, seulement 5% des cancers ont une origine héréditaire (voir partie 1.2.3.1). Dans la majorité des cas, l'apparition d'un cancer est due à l'accumulation d'altérations génétiques au cours de la vie de l'individu. Les substances ou expositions qui causent une ou plusieurs formes de cancers sont dites carcinogènes (Société Canadienne du Cancer, 2020). Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) classe les agents carcinogènes dans cinq groupes (1, 2A, 2B, 3 et 4) selon leur potentiel carcinogénique et les évidences scientifiques disponibles (International Agency for Research on Cancer, 2020). Le groupe 1 recense les carcinogènes bien établis, tandis que les groupes 2A et 2B regroupent les agents probablement ou possiblement carcinogènes (International Agency for Research on Cancer, 2020). Les agents qui ne peuvent être assignés aux groupes 1 ou 2 par manque de preuves scientifiques sont classés dans le

groupe 3, tandis que le groupe 4 regroupe les agents qui ne sont probablement pas cancérigènes (International Agency for Research on Cancer, 2020). Au 10 avril 2020, 120 agents sont classés comme carcinogènes par le CIRC. Ils incluent des causes infectieuses (ex. papillomavirus, Herpès virus humains), physiques (ex. les rayons gammas, ultraviolets), chimiques (ex. aluminium, polychlorobiphényles), et en lien avec les habitudes de vie ou de consommation (ex. tabagisme, alcoolisme, manque d'activité physique et obésité) (International Agency for Research on Cancer, 2020). Les évidences sont parfois très robustes comme pour le tabagisme, où presque 9 cancers du poumon sur 10 sont attribués à la consommation de tabac, avec de nombreuses évidences épidémiologiques et expérimentales à l'appui (Blackadar, 2016).

1.2.4. L'altération des mécanismes qui activent et/ou freinent la prolifération cellulaire est une grande caractéristique du cancer.

1.2.4.1. Les caractéristiques du cancer.

En 2000, une revue de référence intitulée « Les caractéristiques du cancer » traduit de l'anglais « *Hallmarks of cancer* » fut publiée dans le journal *Cell* par Douglas Hanahan et Robert Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2000). Dans cet article, qui est l'un des articles les plus référencés de l'histoire, les auteurs décrivaient les grandes caractéristiques du cancer auxquelles ils en rajoutèrent quatre dans une ré édition parue onze années plus tard (Hanahan et Weinberg, 2011).

Comme mentionné par les auteurs, les cellules cancéreuses ont un fort potentiel prolifératif ainsi qu'une capacité à proliférer indéfiniment (immortalité réplivative). Elles sont souvent insensibles aux signaux qui suppriment la croissance des cellules normales et évoluent avec une forte instabilité du génome, ce qui favorise encore plus l'accumulation de mutations et entraîne un cercle vicieux qui profite au cancer (Hanahan et Weinberg, 2011). Finalement, ces caractéristiques citées peuvent être résumées en une : la capacité d'une cellule à croître et à proliférer continuellement, indépendamment de toutes règles, même en étant endommagée.

1.2.4.2. Notions de voies de signalisation cellulaires, d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs.

Les grandes fonctions cellulaires comme la prolifération sont régulées par des voies de signalisation, aussi appelées « sentiers » ou abusivement « cascades » de signalisation. Ce sont des séquences d'évènements moléculaires, d'interactions et de réactions biochimiques, qui transmettent un signal depuis sa source d'émission jusqu'aux effecteurs de son exécution. Par exemple, un facteur de croissance (ou mitogène) qui se fixe sur certains récepteurs d'une cellule peut déclencher une ou plusieurs voies de signalisation dont la finalité sera la croissance et la division cellulaire. Un oncogène est un gène mutant qui code pour une protéine avec une fonction altérée, pouvant entraîner le

développement du cancer, souvent en apportant un avantage prolifératif (Morgan, 2007). Le proto-oncogène est la version non mutée de l'oncogène, présente dans notre organisme, avec une fonction normale non carcinogène (Morgan, 2007). À l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes codant pour des protéines qui temporisent ou arrêtent la prolifération afin d'éviter les erreurs et mettre hors-jeu les cellules avec un comportement aberrant (Morgan, 2007).

La voie de signalisation RAS/PI3K, aussi appelée axe RAS/PI3K, est un sentier majeur de contrôle de la prolifération cellulaire qui répond justement aux facteurs de croissances (Castellano et Downward, 2011). Elle est d'une importance clé dans le développement du cancer, et les mutations oncogéniques dans cette voie sont généralement associées à des cancers très agressifs (Fernández-Medarde et Santos, 2011). L'axe RAS/PI3K est composé de proto-oncogènes. De fait, il est au centre d'investigations importantes en cancérologie et en biologie cellulaire plus généralement. Une multitude de processus et de voies de signalisation cellulaires parfois antagonistes sont contrôlées par cette voie. La prolifération est le fruit d'une alternance entre phase de croissance et de division cellulaire, impliquant de nombreux mécanismes régulateurs (Morgan, 2007). La voie RAS/PI3K interfère avec plusieurs acteurs majeurs de ces mécanismes, comme les suppresseurs de tumeurs pRB et p53. De plus, même si la voie RAS/PI3K stimule la prolifération dans un contexte normal, elle peut aussi induire un arrêt irréversible appelé « sénescence cellulaire » en cas de trop forte activation : une dualité qui complique son rôle dans le cancer.

Avant d'aborder en détails l'axe RAS/PI3K et d'espérer élucider certains de ses secrets, il est primordial d'avoir une bonne connaissance des mécanismes qui régulent la prolifération cellulaire. Le cycle cellulaire et ses différents acteurs seront discutés, avec un intérêt particulier aux suppresseurs de tumeurs pRB et p53. Par ailleurs, après avoir décrit l'axe RAS/PI3K, nous aborderons la sénescence cellulaire, qui est un mécanisme central en cancérologie, et dont la connexion avec la voie RAS/PI3K est bien établie bien que pleine de mystères.

2. Les mécanismes généraux de promotion de la prolifération.

Afin de maintenir l'homéostasie tissulaire et contrôler la croissance des organismes, la prolifération des cellules est hautement régulée par les étapes du cycle cellulaire. Un être humain adulte est constitué en moyenne de 10 000 milliards de cellules, provenant toutes de la division successive d'une cellule œuf, la cellule d'origine (Meijer, 2003). Bien au-delà du développement embryonnaire, la division cellulaire a lieu durant toute la vie de l'individu pour permettre le renouvellement continu des cellules perdues, en grande partie au niveau de la peau, du tube digestif

et du système hématopoïétique (Meijer, 2003). Le cycle cellulaire est un processus complexe soumis à un ensemble de mécanismes régulatoires, et qui fait intervenir un grand nombre de molécules de façon transitoire et dans un ordre précis (Meijer, 2003).

2.1. Le cycle cellulaire, en quelques mots : notion de point de restriction.

On appelle « cycle cellulaire », la série d'évènements durant laquelle la cellule accomplit la duplication de son génome et se divise en deux, donnant ainsi naissance à deux cellules filles possédant le même contenu génétique (Meijer, 2003). Chez les eucaryotes, on distingue une série de cinq étapes (G0, G1, S, G2 et M) définies par leur fonction et chronologie (voir Figure 1) (Favaudon, 2000). La phase G1 correspond à une « pause » dans le cycle (G pour gap qui signifie intervalle) durant laquelle aucun phénomène lié au cycle cellulaire n'est observable au microscope. Il s'agit d'une étape décisionnelle critique où la cellule normale (non-tumorale) prend la décision de poursuivre un cycle de division ou d'entrer en quiescence : une phase G0 prolongée (Favaudon, 2000). Cette décision de sortir de la quiescence et de rentrer dans un cycle de division dépend de signaux externes, dits mitogènes, qui poussent la cellule à passer une frontière critique appelée « point de restriction » (ou point R) (Meijer, 2003; Pardee, 1974). Le point R peut être assimilé à une frontière de non-retour, suite à laquelle le cycle est irréversiblement engagé jusqu'à la division finale (Meijer, 2003). Les mitogènes sont importants lors du passage du point de restriction. Au-delà, le cycle est conduit de façon inéluctable et indépendamment des facteurs mitogènes (Meijer, 2003; Blagosklonny et Pardee, 2013). La phase S (Synthesis), correspond à l'étape durant laquelle la cellule duplique la totalité de son génome et double sa ploïdie (Favaudon, 2000). La phase G2 (pause 2), est un deuxième arrêt du cycle cellulaire permettant une préparation de la cellule à la mitose et un contrôle de l'intégrité du génome, avant la division (Favaudon, 2000). Enfin, si les conditions le permettent, la cellule rentre en phase M (Mitose) et se divise pour donner naissance à deux cellules filles (Favaudon, 2000). De retour en phase G0, les cellules peuvent quitter le cycle cellulaire et rester à l'état de quiescence. À ce niveau, l'engagement dans un cycle supplémentaire même en présence de mitogènes peut être empêché par des facteurs anti-mitogènes (Meijer, 2003).

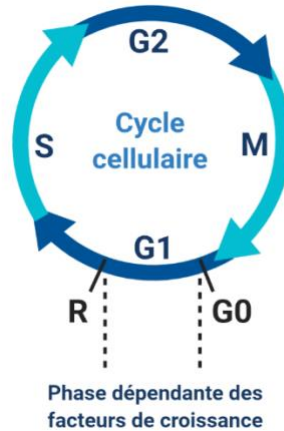


Figure 1: Les phases du cycle cellulaire dépendantes des facteurs de croissance.

© Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

2.2. Les complexes cyclines/CDKs : duos majeurs des transitions du cycle cellulaire.

2.2.1. Les kinases dépendantes des cyclines et leur régulation.

La progression d'une cellule eucaryote à travers son cycle cellulaire est conduite par les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs (Cyclin-Dependent Kinases), une famille d'enzymes à activité kinase qui joue un rôle crucial dans la chronologie bien orchestrée des différentes phases du cycle (Meijer, 2003). À ce jour, plus de 20 protéines ont été identifiées comme membres de cette grande famille sur la base de domaines conservés, propre à l'identité des CDKs (Lim et Kaldis, 2013). Comme toute kinase, chaque membre dispose d'un noyau catalytique renfermant une poche de fixation à l'ATP. Les CDKs possèdent aussi une boucle d'activation appelée « boucle T » et un domaine PSTAIRE (en référence à la séquence d'acides aminés qui le constitue), qui régulent l'association de la CDK avec une cycline (Lim et Kaldis, 2013 ; Morgan, 2007). L'expression des CDKs est globalement invariable durant l'intégralité du cycle cellulaire, ce qui implique que leur activité est contrôlée par des facteurs autres que l'abondance (Favaudon, 2000). Premièrement, l'association de la CDK avec une cycline est essentielle (bien que non suffisante) à son activation, car elle entraîne un changement de conformation qui permet la phosphorylation activatrice de la boucle T (la thréonine 160 pour CDK2 et 161 pour CDK1) (Meijer, 2003 ; Morgan, 2007). Cette phosphorylation entraîne une activation maximale de la CDK et est catalysée par le complexe CAK (CDK-Activating Kinase), qui consiste chez les vertébrés en un oligomère composé de CDK7, la cycline H et la sous unité MAT1 (CDK-activating kinase assembly factor MAT1) (Morgan, 2007). Par ailleurs, deux phosphorylations inhibitrices peuvent avoir lieu dans la voute catalytique des

CDKs ce qui interfère avec la fixation et la catalyse de l'ATP (Morgan, 2007). Ces événements de phosphorylation ont lieu sur deux résidus conservés chez les vertébrés, la thréonine 14 (Thr 14) et la tyrosine 15 (Tyr 15) (Lim et Kaldis, 2013). La kinase WEE1 (Wee1-like protein kinase) est présente chez tous les eucaryotes et catalyse la phosphorylation de la Tyr 15 tandis que MYT1 (Membrane-associated Tyrosine- and Thréonine- specific cdc2- inhibitory kinase), uniquement présente chez les vertébrés, peut phosphoryler les deux résidus (Morgan, 2007). La famille de phosphatases CDC25 (Cell Division Control protein 25) qui contient trois membres (CDC25A, B et C), prend en charge la déphosphorylation de ces résidus ce qui aboutit à l'activation des CDKs (Morgan, 2007). CDC25B et C sont principalement impliquées dans la transition G2/M et ont pour cible primaire CDK1. CDC25A possède un spectre d'activité beaucoup plus large et contribue aux transitions G1/S et G2/M, par sa capacité à déphosphoryler CDK4, CDK6, CDK2 et même CDK1 (Shen et Huang, 2012).

2.2.2. *Les inhibiteurs de CDKs de types INK4 et CIP/KIP.*

Il est clair que la dynamique de phosphorylation/déphosphorylation de la CDK assure un mode de régulation très fin de son statut marche/arrêt. Toutefois, il existe aussi des inhibiteurs de CDKs qui assurent un niveau supplémentaire de contrôle peut-être plus puissant encore. Sur la base de leur structure et de leurs cibles, ceux-ci ont été classés en deux familles : les protéines de type INK4 (Inhibiteur de CDK4) et de type CIP/KIP (CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein) (Besson et al., 2008). La famille INK4 est composée de p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}, les quatre membres ayant la particularité d'inhiber CDK4 et CDK6 en contraignant leur interaction avec la cycline D (Besson et al., 2008 ; Sherr et Roberts, 1999). Les protéines INK4 sont considérées comme des inhibiteurs de phase G1, étant donné que la surexpression de ces protéines provoque un arrêt du cycle à cette étape (Lukas et al., 1995). La famille d'inhibiteurs CIP/KIP est composée de trois membres, p21^{CIP1/WAF1}(p21), p27^{KIP1}(p27) et p57^{KIP2}(p57) et a un spectre d'inhibition beaucoup plus large qui s'étend sur tout le cycle cellulaire (Sherr et Roberts, 1999). À la différence des protéines INK4 dont l'activité bloque l'accès aux cyclines de type D, les CIP/KIP affectent l'activité des complexes CDKs avec les cyclines D, E, A et B, ce qui étend leur rôle jusqu'à l'entrée en mitose (Besson et al., 2008). Bien qu'ayant un rôle majeur, l'action des CIP/KIP ne s'arrête pas à la perturbation de l'activité des CDKs. La progression du cycle peut être perturbée par les protéines CIP/KIP de façon indépendante de ces enzymes. Par exemple, p21 bloque la synthèse de l'ADN en séquestrant le facteur de processivité de la réplication PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Besson et al., 2008 ; Luo et al., 1995). Il s'agit probablement de l'inhibiteur de CDKs le mieux étudié, en partie dû au fait qu'il est une cible transcriptionnelle principale du suppresseur de tumeur p53 (voir partie 3.3) (el-Deiry et al., 1993 ; Fischer, 2017). De plus, l'activité et la localisation

cellulaire de p21 est fortement régulée par diverses modifications post-traductionnelles (Besson et al., 2008). P21 peut aussi interférer avec la voie extrinsèque de l'apoptose et, de fait, son influence est controversée dans la carcinogénèse (Besson et al., 2008). La perte totale de cette protéine est un marqueur inquiétant dans la plupart des cancers, mais à l'opposé, il apparaît aussi que sa sur-expression est associée à des tumeurs agressives et un mauvais pronostic de survie (Besson et al., 2008). Pour conclure, les inhibiteurs de CDKs forment un harmonieux réseau de protéines qui assure un très haut niveau de régulation de l'avancée dans le cycle. Ils sont impliqués dans de nombreux autres processus tel que l'embryogenèse, mais aussi la sénescence, un paradigme sur lequel nous reviendrons plus tard (voir partie 5.2).

2.2.3. *Les cyclines.*

La formation des complexes cyclines-CDKs est l'évènement majeur qui enclenche chaque transition du cycle cellulaire (Meijer, 2003). De multiples combinaisons sont possibles car il existe plusieurs cyclines chez les métazoaires, pour des raisons qui restent encore sujets à débats. Les cyclines ont été découvertes par Timothy Hunt et son équipe en étudiant les divisions cellulaires des œufs d'oursins fécondés dans lesquels ils remarquèrent que certaines protéines sont subitement dégradées à chaque cycle de division et réapparaissent au cycle suivant, d'où l'attribution du nom de « cyclines » (Evans et al., 1983). Le contrôle de l'abondance des cyclines vient premièrement de leur transcription différentielle. Elles sont exprimées et stabilisées à différentes périodes ce qui assure une régulation radicale de leur activité, la présence ou l'absence (Bloom et Cross, 2007 ; Miller et Cross, 2001). De plus, il s'agit de protéines instables avec une demi-vie courte, cela est dû à une forte protéolyse dépendante de l'ubiquitine qui assure leur présence uniquement durant un laps de temps bien défini (Bloom et Cross, 2007 ; Koepp et al., 1999). Les complexes protéiques à activité ubiquitine-ligase SCF (Skp1-Cul1-F-box-protein) et APC (Anaphase-Promoting-Complex) sont deux acteurs essentiels aux évènements de protéolyse des cyclines (Koepp et al., 1999 ; Vodermaier, 2004). De nombreuses études ont montré qu'il est possible de compenser l'activité d'une cycline absente par surexpression ectopique d'une autre cycline (Miller et Cross, 2001). Cela pousse à l'idée que la spécificité des cyclines vient principalement de leur abondance à un moment donné. Cependant, cela n'est pas toujours le cas et il s'avère que certains évènements dépendant d'une cycline ne peuvent pas être restaurés par une autre, ce qui prouve qu'il existe des spécificités intrinsèques aux cyclines. Par exemple, le remplacement chez la levure des cyclines de réplication par des cyclines mitotiques restaure en partie la viabilité mais avec des difficultés à rentrer en réplication (Miller et Cross, 2001). D'après le séquençage du génome humain, il existerait 25 Cyclines (Meijer, 2003). Certaines d'entre elles telles que les cyclines de types D, E, A et B ont été particulièrement bien caractérisées quant à

leur rôle majeur dans les grandes transitions du cycle cellulaire (voir Figure 2). Les cyclines de type D sont les premières à être exprimées et sont capitales pour l'engagement de la cellule dans un cycle de division (voir partie 2.3).

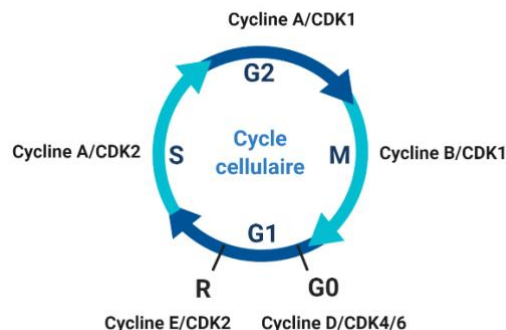


Figure 2: Cinétique d'expression des principaux complexes cycline-CDK dans les grandes phases du cycle cellulaire.

© Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

2.3. Importance des facteurs de croissance dans le cycle cellulaire.

Le passage du point de restriction R en G1 est une étape cruciale pour l'engagement du cycle cellulaire, mais surtout le seul évènement où les facteurs mitogènes sont essentiels (Blagosklonny et Pardee, 2013). En effet, leur retrait empêche l'entrée en phase de réplication des cellules normales (Pardee, 1974). Les facteurs mitogènes, ou facteurs de croissance, sont des molécules d'une grande variété, les plus connus étant le facteur de croissance épidermique EGF (Epidermal Growth Factor), le facteur de croissance transformant TGF (Transforming Growth Factor), ou encore le facteur de stimulation des macrophages CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1) (Alexander et al., 2015 ; Javelaud et Mauviel, 2004 ; Blagosklonny et Pardee, 2013 ; Stanley et al., 1983). Ces molécules activent diverses voies de signalisation à influence mitogénique, par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires souvent de type tyrosine-kinase ou couplés aux protéines G (Meijer, 2003).

2.3.1. Induction de la cycline D par les facteurs de croissance.

Durant la phase G1, la stimulation d'un certain nombre de voies de signalisation par les facteurs de croissance aboutit à l'induction des cyclines de type D (Blagosklonny et Pardee, 2013 ; Zhang et al., 2014). Ce qui fait de ces cyclines, de véritables senseurs des mitogènes (Blagosklonny et Pardee, 2013). Il existe trois types de cyclines D (cycline D1, D2 et D3), étant impliquées dans la transition G1/S et ayant des partenaires CDKs redondants (Wianny et al., 1998 ; Zhang et al., 2014). Les facteurs de croissance régulent la transcription de la cycline D, mais aussi sa stabilisation, sa

localisation nucléaire, et l'association avec ses partenaires catalytiques CDK4 et CDK6 (Blagosklonny et Pardee, 2013 ; Sherr et Roberts, 1999 ; Surmacz et al., 1992 ; Winston et Pledger, 1993) (voir Figure 3). Les cyclines de type D sont des détecteurs car elles sont rapidement induites par les mitogènes, et constamment soumises à une forte dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitine (Diehl et al., 1997 ; Lin et al., 2006). L'engrenage initiale permettant la transition en phase S et l'accomplissement du cycle est déclenché par la cycline D qui, avec la cycline E, assure le passage irréversible du point de restriction (voir partie 2.3.2).

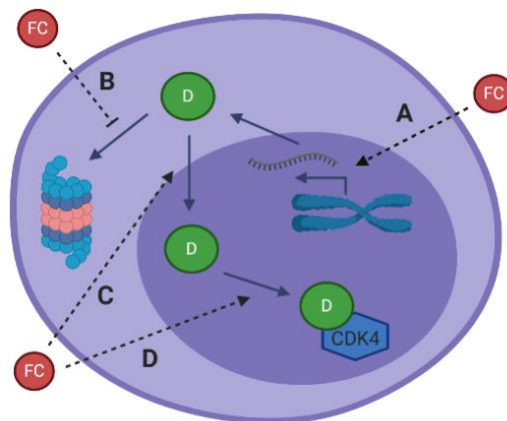


Figure 3: Régulation de la cycline D par les facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance (FC) régulent la cycline D au niveau transcriptionnel (A), et post-traductionnel en inhibant sa dégradation protéasomale (B). De plus, les facteurs de croissance améliorent la translocation nucléaire de la cycline D (C) ainsi que son association avec des CDKs comme CDK4. © Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

2.3.2. La phosphorylation du rétinoblastome pRB: le point de non-retour.

La protéine pRB (produit du gène *RBI*) joue un rôle négatif dans le contrôle du cycle cellulaire, de la croissance, et de la progression tumorale (Giacinti et Giordano, 2006). L'évènement central de la transition G1/S est l'inactivation du rétinoblastome (pRB) par les complexes cyclines/CDKs de phase G1 (Hatakeyama et Weinberg, 1995 ; Henley et Dick, 2012 ; Mitnacht, 1998).

2.3.2.1. Quelques généralités sur *RBI*, le premier gène suppresseur de tumeur identifié.

À l'origine, le rétinoblastome est une tumeur cancéreuse pédiatrique de l'œil à dominance héréditaire qui fut associée dès les années 60-70 à une délétion sur le chromosome 13 correspondant au gène *RBI* (Berry et al., 2019 ; Godbout et al., 1983 ; Lele et al., 1963 ; Yunis et Ramsay, 1978). On sait aujourd'hui que *RBI* est un suppresseur de tumeur puissant, fonctionnellement inactivé dans

de nombreux cancers par mutation/délétion, mais aussi par l'altération de régulateurs en amont (Giacinti et Giordano, 2006).

Par la similarité de séquence, deux autres membres de la même famille que *RBI* ont été identifiés, *RBL1* et *RBL2*, qui codent pour les protéines p107 et p130 respectivement (Henley et Dick, 2012). Les trois protéines pRB, p107 et p130 font parties d'une famille de protéines dites à « poches », qui se caractérise par la présence de deux domaines bien conservés (A et B) séparés par une région dite « d'espacement » (voir Figure 4) (Henley et Dick, 2012). Les trois protéines partagent une fonction redondante qui consiste à bloquer la transition G1/S. Pourtant, il a rapidement été mis en évidence que pRB contrôle un panel de gènes différent de celui sous contrôle de p107 et p130 (Classon et al., 2000 ; Hurford et al., 1997). Il semble alors que les trois partenaires agissent de façon coordonnée pour réguler la transition G1/S.

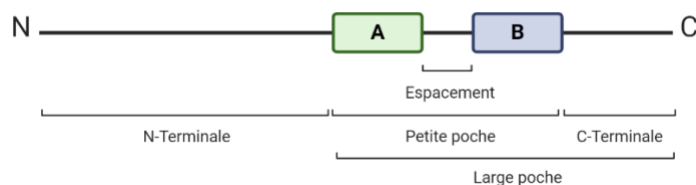


Figure 4: Structure protéique classique de la famille de protéines à poche pRB.

Les deux domaines A et B séparés par la région d'espacement forment ce qu'on appelle la « petite poche ». La région « petite poche » avec la partie C-terminale forme une autre région appelée « large poche ». © Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

2.3.2.2. Interaction de pRB avec la famille de facteurs de transcription E2Fs.

L'une des majeures fonctions de pRB dans le contrôle négatif du cycle cellulaire est son habilité à interagir et à séquestrer les facteurs de transcription E2Fs via la région « large poche » (voir Figure 4) (Henley et Dick, 2012). Il s'agit d'une famille de facteurs de transcription nécessaires à l'induction de multiples régulateurs positifs du cycle cellulaire, tel que des enzymes de biosynthèse des nucléotides, plusieurs cyclines, et diverses protéines impliquées dans la réplication (Blagosklonny et Pardee, 2013 ; Nevins, 1998). Pour des exemples précis, l'expression de l'homologue de la protéine 6 de contrôle de la division CDC6 (Cell Division Control protein 6) et de l'antigène nucléaire de cellule proliférantes PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), toutes deux essentielles au bon déroulement de la réplication, est sous contrôle des facteurs de transcription E2Fs (Henley et Dick, 2012 ; Yan et al., 1998). En phase G1 tardive, l'induction de la cycline D et de son assemblage avec

CDK4 et CDK6 par les facteurs de croissance entraîne une première vague de phosphorylation de pRB (Blagosklonny et Pardee, 2013). La phosphorylation de pRB permet sa dissociation des facteurs de transcription E2Fs, tel que E2F-1, qui peut ainsi induire ses cibles, notamment les cycline E et A (Meijer, 2003 ; Ohtani et al., 1995 ; Pardee et al., 2004). L'induction de la cycline E par E2F-1 marque le passage définitif du point de contrôle. En effet, la cycline E s'assemble avec CDK2 et complète la phosphorylation de pRB avec les complexes cycline D/CDK4-6. Cela entraîne une boucle d'activation de la cycline E qui peut ainsi s'auto-amplifier de façon indépendante de la cycline D, et donc des facteurs de croissance (Blagosklonny et Pardee, 2013). Ainsi, les cyclines D et E, avec la cycline A qui commence à apparaître en phase G1 tardive, coopèrent pour la phosphorylation complète de pRB. Cela assure l'engagement en phase de réplication et l'accomplissement du cycle jusqu'à l'exécution de la mitose, de façon indépendante des facteurs de croissance cette fois-ci.

2.3.2.3. Remodelage de la chromatine par pRB.

La structure tridimensionnelle de la chromatine est malléable et a une grande influence sur l'expression des gènes. Un locus génique peut se trouver dans un état plutôt décondensé (euchromatine, généralement favorable à la transcription), ou condensé (hétérochromatine, généralement défavorable à la transcription) (Huisinga et al., 2006). Les modifications post-traductionnelles des histones telles que la méthylation et l'acétylation sont fortement impliquées dans cet état local de la chromatine et sont médiées par des enzymes spécifiques de méthylation (méthyl-transférase), déméthylation (déméthylase), acétylation (acétyl-transférase) et déacétylation (déacétylase) (Huisinga et al., 2006). D'une manière très générale, l'acétylation des histones est associée à une chromatine permissive à la transcription au contraire de la méthylation qui a tendance à la réprimer (Huisinga et al., 2006).

En plus d'inhiber les facteurs de transcription E2Fs par interaction directe, pRB réprime la transcription par le recrutement de corépresseurs transcriptionnels et de facteurs de remodelage de la chromatine, directement au niveau des promoteurs des gènes cibles (Uchida, 2016). Entre autres, pRB recrute et coopère avec l'histone déacétylase HDAC1 (Histone Deacetylase 1) et la méthyl-transférase DNTM1 (DNA Methyltransferase 1) pour réprimer de façon efficace la transcription de gènes de réponses aux facteurs de transcription E2Fs (Brehm et al., 1998 ; Magnaghi-Jaulin et al., 1998 ; Robertson et al., 2000). De même, pRB interagit avec l'histone méthyl-transférase Suv39h1, connu pour instaurer la triple méthylation sur la lysine 9 des histones H3 (H3K9me3), une modification d'histone essentiellement répressive (Uchida, 2016). Au-delà des modifications d'histones, pRB interagit avec le complexe macromoléculaire SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) (Zhang et al., 2000). Il s'agit d'une holoenzyme qui mobilise l'ATP pour échanger ou

retirer des histones de l'ADN, modifiant ainsi la structure des nucléosomes et la configuration de la chromatine (Uchida, 2016). Le complexe SWI/SNF est un régulateur important de l'expression génique et joue un rôle majeur non seulement dans la différenciation et le destin cellulaire, mais aussi dans le contrôle du cycle cellulaire (Cohet et al., 2010 ; Muchardt et Yaniv, 2001 ; Reisman et al., 2009). Par exemple, la cycline A est réprimée jusqu'à l'expression suffisante de la cycline E par le complexe pRB-SWI/SNF (Zhang et al., 2000). Une façon de contrôler l'ordre d'expression des cyclines et d'éviter l'entrée prématurée en phase de synthèse. On comprend par ces quelques exemples que la répression directe des facteurs de transcription E2Fs par pRB ne constitue qu'un premier niveau de régulation, insuffisant pour maîtriser à lui seul la transition G1/S.

3. Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire indépendants des facteurs de croissance.

Le passage du point de restriction est une étape importante pour l'engagement de la cellule dans son cycle cellulaire. En l'absence de facteurs de croissance, la cellule demeure en quiescence, ou en phase G0, en l'attente de signaux mitogènes. Néanmoins, une cellule peut être en incapacité de s'engager dans un nouveau cycle à la suite de dommages apparus lors de sa précédente période de division, notamment des dommages à l'ADN survenant fréquemment lors de la réplication et la mitose. Il existe des mécanismes dits de points de contrôle à toutes les phases du cycle, qui assurent un arrêt complet de la cellule jusqu'à ce que le dommage soit réparé, d'une façon indépendante des facteurs de croissance. Dans cette prochaine section, nous aborderons brièvement les sentiers moléculaires impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans la transmission du signal aux effecteurs d'arrêt du cycle cellulaire.

3.1. La réponse aux dommages à l'ADN en quelques mots.

Durant l'intégralité du cycle cellulaire, l'ADN est exposé à une multitude de stress et d'agressions pouvant amener à des lésions. Les brisures d'ADN peuvent avoir lieu sur un brin (cassure simple brin) ou sur les deux (cassure double brin), les cassures double brin pouvant entraîner des réarrangements génomiques conséquents. S'ils ne sont pas réparés, de tels événements déclenchent généralement la mort cellulaire mais ils peuvent aussi promouvoir la carcinogénèse. Pour assurer la stabilité du génome, l'évolution a doté la cellule eucaryote d'un incroyable système de détection et de réparation de l'ADN endommagé. Les protéines kinases ATM (Ataxia-Telangiectasia-Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related), présentes dans toutes les cellules eucaryotes, sont des régulateurs fondamentaux de la réponse aux dommages à l'ADN (Awasthi et al., 2015). En cas de lésion, ATR et ATM sont recrutées et activées au niveau de l'ADN endommagé

avec un ensemble de protéines accessoires (Morgan, 2007). Les accidents donnant lieu à la formation d'ADN simple brin activent majoritairement ATR. Cette kinase est nécessaire à la stabilisation et au rétablissement des fourches de réplication suspendues par le stress de réplication (Awasthi et al., 2015 ; Flynn et Zou, 2011). La kinase ATM quant à elle est principalement impliquée dans la réponse aux cassures double brin (Awasthi et al., 2015). Une fois activée, les deux kinases mobilisent une myriade de voies de signalisation qui réduit la progression du cycle cellulaire tout en stimulant l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN endommagé (Morgan, 2007). Les deux effecteurs majeurs de la voie ATM/ATR sont les kinases CHK1 (Check point Kinase 1) et CHK2 (Checkpoint Kinase 2) qui sont recrutées au niveau du site endommagé et présentées aux kinases ATM/ATR par des protéines adaptatrices (Morgan, 2007). Les kinases CHK1 et CHK2 régulent des processus allant de l'arrêt immédiat du cycle cellulaire, l'induction et l'activation d'effecteurs de réparation des dommages, et la mort cellulaire notamment via l'activation du suppresseur de tumeurs p53 (voir partie 3.3) (Bartek et Lukas, 2003). Il existe des différences majeures entre ces deux kinases bien qu'elles soient fortement impliquées dans des processus similaires. CHK1 est restreinte aux phases S et G2 et joue un rôle important dans le contrôle de la progression du cycle, de façon indépendante des dommages à l'ADN (Bartek et Lukas, 2003). La kinase CHK2 quant à elle est présente durant l'intégralité du cycle et reste inactive en l'absence de stress génomique (Bartek et Lukas, 2003). Dans la prochaine section, nous nous intéresserons à la voie ATM-CHK2 et son importance dans la réponse aux dommages perçus en G1.

3.2. La réponse précoce et la réponse tardive : un duel régi par l'intensité du signal.

Les dégâts conséquents tels que les cassures doubles brins de l'ADN requièrent généralement un arrêt complet du cycle cellulaire. La réparation de l'ADN endommagé est une issue possible, suivant laquelle la cellule peut reprendre son cycle de division. Dans le cas contraire, un arrêt trop prolongé entraîne la mort cellulaire par apoptose, ou une entrée en sénescence cellulaire (voir partie 5.2) (Childs et al., 2014). Les cassures doubles brins en G1 impliquent généralement un arrêt robuste étant donné que la cellule, n'ayant pas dupliqué son ADN, ne peut pas utiliser l'une des chromatides sœurs comme modèle (principe de la recombinaison homologue) de réparation (Zhao et al., 2017). Dans tous les cas, l'intensité du signal d'arrêt est proportionnelle au dommage et représente un point critique qui détermine le destin cellulaire. Dans un premier temps, la voie ATM-CHK2 arrête le cycle cellulaire en modulant l'activité d'effecteurs importants tels que la phosphatase CDC25A (Falck et al., 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, CDC25A déclenche la transition G1/S en retirant des phosphorylations inhibitrices sur plusieurs CDKs (voir partie 2.2) (Morgan, 2007). CHK2 procède à la phosphorylation de CDC25A, ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation

par le protéasome. On parle de réponse précoce, étant donné la rapidité de la réaction et son caractère transitoire (Morgan, 2007). En parallèle, ATM et CHK2 active aussi par phosphorylation le suppresseur de tumeur p53, un facteur de transcription à large spectre qui régule l'expression d'un grand nombre de gènes codants pour des protéines impliquées entre autres dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages, et la mort cellulaire par apoptose (voir partie 3.3) (Hirao et al., 2000 ; Morgan, 2007). L'une des cibles principales de p53 est l'inhibiteur du cycle p21, que nous avons décrit précédemment (voir partie 2.2.2) (Brady et Attardi, 2010). On parle ici de réponse tardive, ou différée, étant donné qu'elle repose sur un programme transcriptionnel et non sur une dynamique de phosphorylations. Il en résulte aussi un arrêt beaucoup plus robuste, dont l'issue peut être l'apoptose ou la sénescence cellulaire, si le dommage n'est pas rapidement réparé (Mallette et Ferbeyre, 2007). Dans la prochaine partie, nous aborderons plus en détails les caractéristiques et les fonctions du suppresseur de tumeur p53, car celui-ci joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le cancer.

3.3. *Le suppresseur de tumeur p53 : le « gardien du génome ».*

3.3.1. *Généralité*

Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription induit par divers stress cellulaires tels que les dommages à l'ADN, l'hypoxie, l'activité aberrante des oncogènes, la privation de nutriments ou encore la dysfonction des ribosomes (Brady et Attardi, 2010). En réponse à de telles injures, p53 instaure un programme transcriptionnel complexe qui converge vers un arrêt du cycle cellulaire, puis la mort cellulaire par apoptose ou encore une entrée sénescence (Brady et Attardi, 2010 ; Morgan, 2007). De par son rôle central dans la réponse au stress génotoxique, p53 a rapidement été baptisé « gardien du génome » (Lane, 1992). Les cibles transcriptionnelles de p53 comprennent des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, l'autophagie, le métabolisme et bien d'autres fonctions encore (Brady et Attardi, 2010). En fait, il s'agit d'un facteur de transcription pléiotrope finement régulé, dont l'impact transcriptionnel varie en fonction de la nature du dommage et de sa sévérité.

La famille de gènes *p53* compte trois membres : *p63*, *p73* et *p53* lui-même (Belyi et al., 2010). On retrouve un gène ancestral nommé *p63/p73* semblable à *p63* et *p73*, chez les organismes unicellulaires primitifs Choanoflagellés et chez l'anémone de mer (Belyi et al., 2010). À la suite d'une duplication, un gène apparenté à *p53* apparaît pour la première fois chez les poissons cartilagineux (Belyi et al., 2010). On suppose que la fonction d'origine de *p53* était de préserver l'intégrité génomique des cellules germinales étant donné que le gène ancestral hybride *p63/p73* chez l'anémone

de mer et la drosophile sert à promouvoir l'apoptose des gamètes ayant subi des dommages à l'ADN (Belyi et al., 2010). Avec l'émergence d'organismes plus complexes comme les vertébrés, la notion de renouvellement des tissus a pris d'avantage d'importance. Cela implique beaucoup de divisions cellulaires et donc une surveillance du génome en continue, au-delà du développement embryonnaire ou de la production des gamètes. L'histoire évolutive de la famille *p53* fait donc intervenir un premier ancêtre *p63/p73* initialement présent pour protéger les lignées germinales, qui fut dupliqué dans des vertébrés primitifs pour étendre sa protection aux cellules somatiques et donc, éviter l'apparition de cancers. Actuellement, *p53* est une cible majeure en cancérologie, étant donné les innombrables preuves de son rôle dans la suppression tumorale.

3.3.2. Une brève histoire de la découverte de *p53*.

3.3.2.1. La piste initiale de l'oncogène.

L'arrivée de *p53* sur la scène de l'oncologie prend place dans les années 1970, dans un contexte où la recherche fondamentale portait beaucoup d'intérêt aux causes virales du cancer (Levine et Oren, 2009). À cette époque, l'induction de tumeurs sur des modèles animaux avec des virus comme le SV40 (Simian Virus 40) avait déjà mis en évidence que ceux-ci exprimaient certains peptides viraux au sein des tumeurs (Levine et Oren, 2009). Les anticorps produits par l'hôte infecté contre ces oncoprotéines virales étaient alors utilisés comme outil pour immunoprécipiter ces peptides, afin de les étudier. Au cours de la même année 1979, cinq groupes rapportèrent la présence d'une protéine aux alentours de 53 kDa, prise en complexe avec le large antigène T du virus SV40 (Kress et al., 1979 ; Lane et Crawford, 1979 ; Linzer et Levine, 1979 ; Melero et al., 1979 ; Smith et al., 1979). Rapidement, il fut mis en évidence que cette protéine n'était pas spécifique aux cancers induits par le SV40, mais était aussi présente en abondance dans d'autres types de tumeurs (Levine et Oren, 2009). De part cette interaction forte avec l'antigène T du SV40, plus le fait qu'il est à peine détectable dans les cellules non-transformées, *p53* fut tout d'abord suspecté d'être un oncogène. Quant au terme *p53*, il fut attribué lors du premier congrès scientifique en son honneur qui eut lieu en 1983 à Oxted (Angleterre), en raison de sa masse moléculaire estimée aux alentours de 53 kDa (Levine et Oren, 2009). L'idée de l'oncogène *p53* prit encore plus d'ampleur après que divers groupes avancèrent que la surexpression de *p53* pouvait favoriser la transformation de cellules primaires (Levine et Oren, 2009). On sait maintenant que ces erreurs d'interprétations venaient du fait que l'ARN utilisé pour cloner la séquence codante de *p53* était à chaque fois issu de cellules tumorales ou *p53* avait subi de nombreuses modifications. La protéine *p53* exprimée n'était pas fonctionnelle et pouvait se comporter à l'inverse, comme un dominant négatif.

3.3.2.2. Un suppresseur de tumeur finalement ?

L'opinion d'origine sur la fonction prétendument oncogénique de p53 prit rapidement du « plomb dans l'aile » dans les années 1980 et ce à plusieurs reprises. Il fut mis en évidence que la séquence codante pour p53 était massivement altérée dans la lignée cellulaire HL60, issue d'une leucémie humaine, rendant impossible l'expression de p53 (Wolf et Rotter, 1985). Mais surtout, le laboratoire d'Arnold Levine développa un nouveau clone de l'ADN complémentaire de p53 qui, contre toute attente, était incapable de reproduire les effets transformants préalablement observés (Levine et Oren, 2009). Ce paradoxe fut assez vite démantelé par des analyses de séquences qui indiquèrent des différences majeures entre les différents clones. La séquence murine de *p53* sauvage fut alors établie à partir d'un tissu normal, indiquant clairement que l'essentiel des clones utilisés jusqu'à lors étaient mutés (Levine et Oren, 2009). De fait, même si des formes mutantes de p53 peuvent favoriser la transformation, ce n'est absolument pas le cas des formes sauvages. Au contraire, on montrera que la sur expression de la forme sauvage de p53 réprime la transformation de cellules en culture induite par des oncogènes comme RAS et MYC (Eliyahu et al., 1989 ; Finlay et al., 1989). Dans la foulée, de nombreux groupes ont concentré leurs efforts sur la caractérisation de *p53* dans les tumeurs humaines, et on sait aujourd'hui que celui-ci est muté dans pas moins de la moitié d'entre elles (Brady et Attardi, 2010 ; Levine et Oren, 2009). *P53* se voit alors propulsé au rang du gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Le doute sur le caractère suppresseur de tumeur de p53 n'était « plus permis » lorsque la première lignée de souris « knock-out » fut établie en 1992 (Donehower et al., 1992). En effet, ces souris paraissent normales mais développent rapidement de nombreux cancers. À la suite de ces découvertes, p53 devint le suppresseur de tumeur le plus attractif et un grand nombre de groupes se mirent à étudier ses fonctions dans la suppression tumorale.

3.3.3. Structure et régulation de *p53*.

3.3.3.1. Structure

Chez l'humain, le gène *p53* code une protéine de 393 acides aminés. L'extrémité N-terminale de p53 est hautement conservée et comprend deux domaines de transactivation transcriptionnelle (DTAD), TAD1 et TAD2, au niveau des résidus 1-40 et 40-60 respectivement (voir Figure 5). Ces deux domaines sont particulièrement importants pour orchestrer la transcription de gènes spécifiques et subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles (Raj et Attardi, 2017). Une variété de coactivateurs transcriptionnels incluant des enzymes de modification des histones et de remodelage de la chromatine sont recrutés par cette partie de p53 (Brady et Attardi, 2010 ; Raj et Attardi, 2017). *P53* régule une panoplie de gènes d'une façon bien ordonnée, aboutissant à des phénotypes parfois

totalemment distincts comme l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Cette pléiotropie de p53 vient en partie de ces deux domaines DTAD et de leur capacité à activer un panel de cibles spécifiques, notamment par l'interaction avec des cofacteurs transcriptionnels différents (Raj et Attardi, 2017). Le domaine TAD1 est indispensable à l'activation des cibles générales de p53 en réponse aux injures à l'ADN, incluant des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose tels que *p21* (ou *CDKN1A*, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*), *PMAIP1* (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*) et *BBC3* (*Bcl-2-Binding Component 3*) (Raj et Attardi, 2017). En contrepartie, des études chez la souris suggèrent que le TAD2 est important pour maintenir le rôle suppresseur de tumeurs de p53 (Brady et al., 2011). Ces études montrent que ces deux domaines sont impliqués dans des programmes transcriptionnels bien différents et que les principales cibles de p53 sont loin d'être suffisantes pour maintenir son rôle dans la suppression tumorale (Raj et Attardi, 2017). La suite de la protéine comporte un domaine riche en proline (DRP), dont la fonction semble être purement structurale, suivit du domaine de fixation à l'ADN qui s'étend entre les acides aminés 100 à 300 (Brady et Attardi, 2010) (voir Figure 5). Cette partie est essentielle à l'encrage de p53 sur la chromatine. Elle assure sans ambiguïté sa fonction la plus importante dans la suppression tumorale étant donné que la majorité des cancers associés à p53 sont porteurs de mutations dans ce domaine et affectent sa fixation à l'ADN (Brady et Attardi, 2010). Pour finir, la partie C-terminale de p53 comprend un domaine d'oligomérisation (ou tétramérisation) et un domaine basique riche en lysines (Brady et Attardi, 2010) (voir Figure 5). Le domaine de tétramérisation est essentiel à la fonction transcriptionnelle de p53 car celui-ci interagit avec ses éléments de réponse sous forme de tétramère (Brady et Attardi, 2010). Quant au domaine basique riche en lysines, il s'agit probablement de la partie la moins connue de p53, mais il semblerait qu'elle participe à la régulation et la stabilisation des tétramères p53 avec des cibles ADN spécifiques (Laptenko et al., 2015).

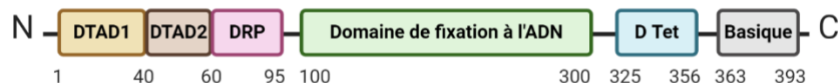


Figure 5: Domaines et structure de la protéine p53.

© Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

3.3.3.2. Régulation de la transcription par p53 : quel gène et quand ?

P53 est un facteur de transcription à large spectre qui régule un nombre important de cibles transcriptionnelles. L'activité de p53 vis-à-vis de ces cibles dépend de trois grandes étapes à savoir sa stabilisation, sa fixation stable à une cible d'ADN et son activation (Kruse et Gu, 2009). Dans un contexte normal de cellules non stressées, p53 est présent en quantité dérisoire. Cela est dû à une forte dégradation protéasomale médiée par l'ubiquitine qui assure une disparition quasi complète de la protéine. MDM2 (Murine Double Minute 2) est l'ubiquitine ligase responsable en immense partie de cette dégradation en continu de p53 (Moll et Petrenko, 2003 ; Kruse et Gu, 2009). Les 6 lysines du domaine N-terminal sont les principaux sites d'ubiquitination de p53 (Kruse et Gu, 2009). MDM2 possède une forte affinité pour p53 et leur interaction est régulée à de nombreux niveaux (Moll et Petrenko, 2003). En cas de dommages à l'ADN, p53 subit une vague de phosphorylations dans son domaine N-terminal majoritairement. Les sérines 15 et 20 sont particulièrement importantes et sont phosphorylées par les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2 (voir partie 3.1) (Kruse et Gu, 2009). Ces phosphorylations réduisent fortement l'affinité entre les deux protéines et libèrent p53 de son inhibiteur MDM2 (Kruse et Gu, 2009). De nombreux acteurs protéiques interviennent dans la régulation de l'association MDM2-p53, notamment le suppresseur de tumeur ARF. Cette protéine fixe directement MDM2 et inhibe son activité ubiquitine ligase ce qui limite l'interaction avec p53 et améliore fortement sa stabilité (Kruse et Gu, 2009). P53 contient de nombreux résidus pouvant subir des modifications post-traductionnelles et beaucoup d'entre elles jouent un rôle dans sa stabilité et/ou son activité (Meek et Anderson, 2009). Par exemple, l'acétylation du domaine C-terminal est particulièrement influente car elle rentre en compétition avec l'ubiquitination et aide à stabiliser p53 (Kruse et Gu, 2009). Enfin, une chose remarquable chez p53 est sa faculté à induire une cible transcriptionnelle plus qu'une autre selon les modifications biochimiques qu'il subit et les partenaires protéiques qu'il rencontre. L'acétylation de la lysine 120 par CBP/P300 par exemple, qui n'affecte ni la stabilité ni la fixation de p53 à l'ADN, est toutefois essentielle à la transcription des gènes pro-apoptotiques *BBC3* et *BAX* (*BCL2 Associated X*) alors qu'elle n'est pas nécessaire à l'expression de *p21* et *MDM2* (Kruse et Gu, 2009). À l'instar du code histone, il semblerait donc qu'il existe un code p53 qui permette de réguler son programme transcriptionnel. En fait, p53 est toujours présent en quantité minimale dans le noyau et occupe en continu un certain nombre de sites sans en activer la transcription. Une activation incontrôlée de p53 serait de toute manière létale pour la cellule qui a dû élaborer un réseau régulateur extrêmement efficace lui permettant d'utiliser p53 à bon escient et en temps voulu.

3.3.3.3. Les grandes fonctions de p53.

La principale fonction de p53 à l'échelle de l'organisme est d'éviter la transformation tumorale. Comme nous l'avons mentionné brièvement, la fonction d'origine de p53 serait d'induire l'apoptose des lignées germinales et des cellules embryonnaires ayant subi des dommages à l'ADN (Belyi et al., 2010). Il s'agit d'un principe important pour empêcher la naissance d'individus dégénérés au profit des individus sains. Avec la diversification des espèces, la notion de renouvellement cellulaire de plus en plus présente a étendu le besoin d'une surveillance du génome à l'échelle de l'individu. Ainsi, l'émergence de p53 permet un contrôle qualité du contenu génomique et une prévention du cancer (Brady et Attardi, 2010). Classiquement, p53 induit trois grandes réponses en riposte aux injures génomiques : l'arrêt du cycle cellulaire (1), la mise en place de processus de réparation de l'ADN (2) qui peuvent être suivies par une entrée en sénescence ou en apoptose (3) selon la gravité du dommage. Toutefois, il est important de rappeler que p53 contrôle aussi d'autres phénomènes comme le métabolisme énergétique et l'autophagie, pouvant eux aussi avoir une importance dans le cancer (Brady et Attardi, 2010). D'après les connaissances actuelles, les fonctions de p53 sont principalement dues à son activité transcriptionnelle, bien qu'un certain nombre de fonctions indépendantes de la transcription ont été rapportées.

3.3.3.3.1. *Rôle transcriptionnel.*

Comme nous l'avons abordé précédemment, p53 se fixe à l'ADN sous la forme de tétramères. Les éléments de réponses reconnus par p53 (p53RE) sont composés de deux copies d'un motif de 10 paires de bases, ayant la séquence consensus 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Pu représente une base purique et Py une base pyrimidique) et étant séparés par un espace de 0 à 13 paires de bases (Sullivan et al., 2018). L'une des cibles principales de p53 est le gène *p21* (ou *CDKN1A*) codant pour l'inhibiteur du cycle p21 (voir partie 2.2.2). P21 est très important pour l'arrêt du cycle en G1/S et en G2/M médié par p53. Les gènes *BTG2* (*BTG anti-proliferation factor 2*), *GADD45A* (*Growth Arrest and DNA Damage inducible Alpha*) et *SFN* (*Stratifin*) sont aussi des cibles transcriptionnelles directes qui participent à l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53 (Fischer, 2017). L'induction prolongée de ces cibles peut induire la sénescence cellulaire (voir partie 5.2), en partenariat avec d'autres cibles de p53 comme *PAI1* (*Plasminogen-Activator Inhibitor 1*) et *PML* (*Promyelocytic Leukemia*) (Brady et Attardi, 2010). De même, p53 induit la mort cellulaire par apoptose, notamment via l'expression du gène *FAS* codant pour le récepteur à domaine de mort FAS, ainsi que des membres de la famille *BCL-2* (*B-Cell Lymphoma 2*) incluant *BAX*, *BBC3* et *PMAIP1* (Fischer, 2017). D'autres grandes fonctions canoniques de p53 à savoir la régulation du métabolisme et de l'autophagie dépendent aussi de la transcription de cibles comme *TIGAR* (*TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase*) et

AMPK (*AMP-activated protein Kinase*) ou encore *ULK1* (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*) et *ULK2* (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 2*), très impliqués dans l'autophagie (Brady et Attardi, 2010 ; Fischer, 2017). Une cible majeure de p53 est son propre inhibiteur MDM2, important pour temporiser le signal et éviter une activité trop prolongée ou exacerbée de p53 (Brady et Attardi, 2010).

Bien sûr, nous brossons ici un portrait très générique des fonctions de p53 permises par son activité transcriptionnelle, mais il s'avère que celui-ci impact sur un nombre considérable de cibles. On estime qu'il y a environ 2200 gènes activés par p53, et en moyenne 2700 gènes réprimés (Engeland, 2018). Pour autant, il s'avère que celui-ci ne fixe que 3% des gènes qu'il réprime et les dernières découvertes suggèrent que la répression transcriptionnelle induite par p53 est exclusivement indirecte (Engeland, 2018). En fait, le responsable de cette répression consécutive n'est autre que p21. Une fois induit, ce puissant inhibiteur de CDK prévient la phosphorylation des protéines p107 et p130 de la famille de pRB, leur permettant de s'assembler avec d'autres protéines pour former un complexe répresseur appelé complexe DREAM (Dimerization partner, RB-like, E2F And Multivulval class B). Ce complexe se fixe à de nombreuses régions promotrices de type E2F ou CHR (Cell Cycle gene Homology Region) et réprime la transcription (Engeland, 2018). Ainsi, p53 réprime une panoplie de gènes ayant des rôles primordiaux dans la progression du cycle tels que *CDK1* (*Cyclin Dependant Kinase 1*), les cyclines de type B, les phosphatases CDC25, et des kinases mitotiques comme *PLK1* (*Polo Like Kinase 1*) (Engeland, 2018 ; Fischer, 2017). Bien que p53 entraîne l'expression et la répression d'un grand nombre de gènes, ce n'est pas un répresseur transcriptionnel et son impact négatif sur la transcription dépend de sa cible principale p21.

3.3.3.3.2. Rôle non-transcriptionnel.

L'impact transcriptionnel de p53 est de loin sa fonction la mieux étudiée notamment vis-à-vis de son rôle dans la suppression tumorale. Cependant, certaines fonctions de p53 indépendantes de la transcription ont été caractérisées, notamment dans des processus comme l'apoptose et la réponse aux dommages à l'ADN (Brady et Attardi, 2010 ; Setton et Powell, 2018 ; Speidel, 2010 ; Yoon et al., 2019). En effet, p53 sous sa forme cytoplasmique interagit avec les protéines anti-apoptotiques de type BCL-2 et les séquestre, ce qui favorise l'oligomérisation des protéines apoptotiques BAK (BCL-2 homologous Antagonist/Killer) et BAX pour la perforation de la membrane mitochondriale (Brady et Attardi, 2010 ; Speidel, 2010). Au même titre, il a récemment été montré que p53 pouvait augmenter le déchirement mitochondrial en favorisant l'accumulation de calcium. Cet effet passe par une interaction avec la protéine SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase) qui aide à l'accumulation de calcium dans le lumen du réticulum endoplasmique et son transfert dans la

mitochondrie (Kroemer et al., 2015). Ces deux phénomènes sont d'avantage prononcés que les niveaux de p53 sont hauts et envahissent le cytoplasme, cela probablement pour renforcer un état apoptotique déjà bien amorcé au niveau nucléaire. À ce titre, les niveaux de p53 nucléaire peuvent aussi jouer des rôles non-transcriptionnels. Par exemple, il a été montré que p53 joue un rôle important dans la restauration des fourches de réplication bloquées (Setton et Powell, 2018). Ici, p53 interagit avec des modulateurs de l'état local de la chromatine qui permettent le recrutement d'effecteurs importants pour la reprise de la réplication (Setton et Powell, 2018). Par ces quelques exemples, on constate que l'impact de p53 va au-delà de son rôle de facteur de transcription et dans certains cas comme l'apoptose, celui-ci vient consolider des phénomènes qu'il a lui-même déclenché au niveau transcriptionnel.

3.3.4 Mutations de p53 dans le cancer : de la délétion au gain de fonction.

Le gène *p53* est le plus fréquemment altéré dans les tumeurs humaines, et environ la moitié de celles-ci sont porteuses de mutations dans *p53* (Brady et Attardi, 2010). De plus, on constate l'apparition spontanée de cancers chez les souris dépourvues de *p53*, et certaines maladies congénitales comme le syndrome de Li-Fraumeni qui prédispose à divers cancers sont dues à des mutations germinales de *p53* (Brady et Attardi, 2010). Les mutations dans *p53* peuvent être classées en trois catégories. La première consiste à bloquer ou atténuer l'activité transcriptionnelle de p53. Deuxièmement, certaines mutations peuvent entraîner la production de dominants négatifs qui forment bien souvent des agglomérats avec la protéine sauvage et inhibent sa fonction. Enfin, il existe des mutations dites gains de fonctions capables de corrompre p53 et de favoriser la tumorigénèse. De manière inattendue, seulement 10 à 15 % des mutations de p53 chez l'humain mènent à la production d'une protéine tronquée ou inactive (Perri et al., 2016). Dans la plupart des cas, les mutations ont lieu dans son domaine de fixation à l'ADN codée par les exons 4 à 9, entraînant la production d'une protéine entière et en partie fonctionnelle (Perri et al., 2016). Par ailleurs, plusieurs résidus « hot spot » de mutations (comme les acides aminés R175, G245, R248, R249, ou R27) ont été caractérisés et le top 10 de ceux-ci compte pour environ un tiers de l'ensemble des mutations (Baugh et al., 2018 ; Rivlin et al., 2011). Cela indique que des points spécifiques de p53 sont cruciaux pour son activité suppressive de tumeur. Les mutations gains de fonctions peuvent permettre à p53 de contribuer à la tumorigénèse et d'avoir des fonctions totalement opposées à celles d'origine. Généralement, le pouvoir apoptotique de p53 est perdu au cours du développement tumoral, car il représente l'ultime barrière à toute transformation (Perri et al., 2016). Certaines de ces cibles transcriptionnelles peuvent être maintenues et même exacerbées si elles apportent un avantage à la cellule cancéreuse. Par exemple, sa cible principale *p21*, qui joue un rôle capital dans l'arrêt du cycle cellulaire, peut avoir

des effets oncogéniques notamment via l'inhibition de l'apoptose ou la promotion des complexes cyclinD-CDK4/ 6 (Abbas et Dutta, 2009). Avec ces informations, on constate que l'activité transcriptionnelle fidèle de p53 est importante pour la prévention tumorale mais aussi que d'une certaine manière, sa perte totale ne semble pas être la voie la plus efficace pour supporter la transformation. Au contraire, maintenir certaines formes corrompues de p53 peut apporter un avantage de survie et de résistance au stress, choses que subissent de manière intense les cellules cancéreuses.

4. Les voies de signalisation mitogéniques sous contrôle des facteurs de croissance : l'axe RAS/PI3K.

Les facteurs de croissance activent des voies de signalisation mitogéniques qui permettent à une cellule d'entrer dans un cycle de division et de le compléter. Pour éviter une promotion exacerbée de la croissance et de la prolifération, ces voies de signalisation sont hautement contrôlées et de nombreux mécanismes de rétroaction négative existent. Les protéines RAS sont des transducteurs clés des facteurs de croissance, à la tête d'un réseau complexe de signalisation cellulaire. RAS contrôle la prolifération, la croissance, ainsi que la survie par la voie des MAPs Kinases (Mitogen-Activating-Protein-Kinase) aussi appelée voie RAS/RAF/MEK/ERK et de la PI3-kinase/mTOR/AKT (PI3K/AKT ou voie PI3K, pour Phosphoinositide-3-Kinase). Au-delà de son rôle important dans le passage du point de restriction (R), RAS influence de nombreux événements du cycle cellulaire allant jusqu'à la transition G2/M. Par ailleurs, ce triangle signalétique est un noyau oncogénique très puissant d'une importance fondamentale en cancérologie.

4.1. Les protéines RAS.

4.1.1 La Découverte des protéines RAS et l'entrée dans l'ère des oncogènes.

RAS est ni plus ni moins le premier oncogène à avoir été caractérisé. À l'instar de p53, sa découverte s'inscrit dans la période intense de la virologie tumorale. À l'origine, deux protéines virales qui entraînaient des sarcomes chez le rat furent identifiées par Harvey et Kirsten dans les années 1960 (Cox et Der, 2010 ; Malumbres et Barbacid, 2003). Baptisées au départ V-SRC (Virus – Sarcoma), puis V-RAS (Virus-Rat-Sarcoma), avec l'initiale de son découvreur : V-H-RAS et V-K-RAS en référence à Harvey et Kirsten (Malumbres et Barbacid, 2003). Dans les années 1970, des expériences de transfert d'ADN génomique issu de lignées tumorales (humaines et murines) dans des fibroblastes murins démontraient que des composants non viraux pouvaient entraîner la

transformation. Ces découvertes représentent alors un premier pas vers la piste des oncogènes cellulaires. Par la suite, il fut démontré que des fibroblastes murins transformés par l'insertion d'ADN isolé de tumeurs humaines présentaient dans leur génome des séquences additionnelles ressemblant à l'oncogène V-RAS. On comprit alors que ces oncogènes viraux et cellulaires étaient en réalité des homologues (Chang et al., 1982 ; Gimple et Wang, 2019 ; Malumbres et Barbacid, 2003). Depuis, un très grand nombre d'études ont détaillé l'importance de RAS en tant qu'oncogène, mais surtout en tant que membre d'une grande famille de protéines ayant un rôle primordial dans la signalisation cellulaire.

4.1.2. Les protéines RAS : des alternateurs biologiques.

4.1.2.1. La superfamille des protéines RAS.

La super famille des protéines RAS compte plus de 150 membres et joue des rôles divers et variés dans la signalisation cellulaire (Wennerberg et al., 2005). Ceux-ci ont été classés en 5 branches principales, les protéines RAS, RHO (Ras Homologous), RAB (Ras-Associated Binding), RAN (Ras-related Nuclear protein) et ARF (ADP Ribosylation Factor), selon leur similarité structurale et fonctionnelle (Wennerberg et al., 2005). Toutes ces protéines partagent la particularité d'être des alternateurs biologiques, qui oscillent entre un état activé lorsqu'elles sont associées à une guanosine tri-phosphate (GTP), et inactif lorsqu'elles sont liées à la guanosine di-phosphate (GDP) (Wennerberg et al., 2005). Elles possèdent par ailleurs une activité GTPasique qui leur permet de convertir le GTP en GDP par hydrolyse (voir Figure 6). Les protéines RAS ont une haute affinité pour ces deux nucléotides, et peu d'activité hydrolytique propre. Leur activation requière des facteurs d'échange guanyliques (GEF pour Guanine-Exchange-Factor) qui favorisent la fixation au GTP (Wennerberg et al., 2005). À l'inverse, des protéines activatrices de GTPases (GAP pour GTPase-Activating Protein) améliorent considérablement l'activité GTPasique ce qui entraîne un retour à l'état inactif et fixé au GDP (voir Figure 6). Beaucoup de protéines RAS subissent aussi des modifications post-traductionnelles lipidiques, celles-ci sont importantes pour leur adressage à certains compartiments membranaires (Wennerberg et al., 2005).

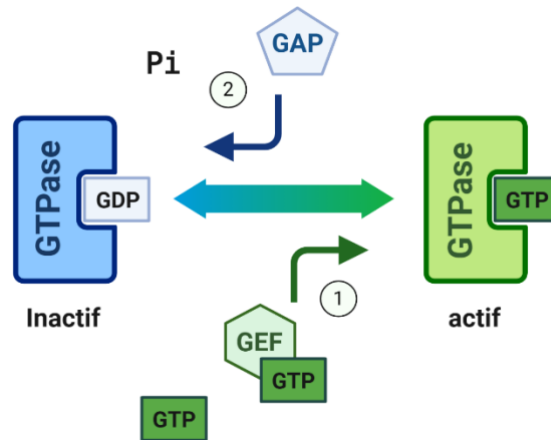


Figure 6: Cycle d'activation/inactivation des protéines GTPases.

1) Les facteurs d'échanges guanyliques (GEF) favorise l'association GTPase-GTP permettant la formation d'un complexe actif. 2) À l'inverse, des protéines activatrices de GTPases favorisent l'hydrolyse du GTP par la GTPase et donc un retour à l'état inactif. © Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

4.1.2.2. La sous-famille des protéines RAS.

Les membres de la sous-famille RAS, que nous appellerons ici RAS ou protéines RAS dans un souci de simplification, sont activés par divers stimuli relayés par des récepteurs membranaires comme les récepteurs à tyrosines kinases (RTK), les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et certaines intégrines (Gimple et Wang, 2019). Chez l'humain, les protéines RAS comprennent trois gènes, *H-RAS*, *N-RAS* et *K-RAS* qui codent pour quatre isoformes, *H-RAS*, *N-RAS*, *K-RAS4A* et *K-RAS4B*, les deux derniers étant le fruit d'un épissage alternatif du gène *K-RAS* (Gimple et Wang, 2019). Il a été montré que les trois proto-oncogènes *RAS* peuvent induire la transformation des fibroblastes murins (Castellano et Santos, 2011). De plus, les quatre isoformes partagent 82 à 90% d'identité de séquence et jouent des rôles redondants dans la prolifération, la survie cellulaire et le métabolisme (Hobbs et al., 2016). Il est néanmoins de plus en plus clair que des différences fonctionnelles significatives existent entre ceux-ci. Premièrement, malgré une expression ubiquitaire, on constate une disparité d'expression génique en fonction des organes (Castellano et Santos, 2011). Par exemple, les niveaux d'ARNm de *H-RAS* sont haut dans le cerveau et le muscle, tandis que *K-RAS* s'exprime majoritairement dans l'intestin et le thymus (Castellano et Santos, 2011). Mais surtout, on observe des divergences dans l'adressage des isoformes RAS aux différents compartiments membranaires, du fait des modifications post-traductionnelles lipidiques que rencontrent ces protéines lors de la maturation (Castellano et Santos, 2011). En fonction du compartiment qu'elles

occupent, il est probable que les isoformes RAS interagissent avec des régulateurs différents qui modulent leur activité. Un point commun aux isoformes RAS est leur forte implication dans le contrôle du cycle cellulaire. Des études de transcriptomique ont d'ailleurs montré que le profil transcriptionnel normalement induit par le sérum en phase G1 est compromis par l'absence de RAS (Meloche et Pouyssegur, 2007). Il est maintenant clair que RAS affecte la prolifération en impactant divers acteurs de la transition G1-S mais aussi de la phase G2/M (Meloche et Pouyssegur, 2007 ; Okumura et al., 2002 ; Palmer et al., 1998).

4.2. *Voies de signalisation sous contrôle de RAS.*

4.2.1. *Principe d'activation générale de RAS par le biais d'un récepteur à tyrosine kinase (RTK).*

Dans le cas des RTKs, la fixation d'un ligand tel qu'un facteur de croissance entraîne la dimérisation du récepteur suivie d'une vague d'autophosphorylations qui se propagent dans son domaine C-terminale intra cytoplasmique. Ces phosphorylations ont lieu sur des résidus spécifiques et deviennent des modules de reconnaissance pour les protéines ayant un domaine d'homologie Src-2 (-SH2 pour Src-homology2). La protéine d'échafaudage GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) avec d'autres protéines adaptatrices sont alors recrutées au récepteur et recrutent à leur tour la protéine SOS (Son Of Sevenless). SOS est une protéine d'échange guanylique qui convertit RAS dans sa forme active (voir Figure 6-7). RAS déclenche ensuite plusieurs voies de signalisation et notamment la voie RAS/RAF/MEK/ERK, aussi appelée voie des protéines kinases activées par les mitogènes ou MAPK (Mitogen-Activated Proteins Kinases) (voir Figure 7). RAS active aussi la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Cette dernière active la protéine kinase B (PKB ou AKT pour RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) et la cible de la rapamycine chez les mammifères mTOR (Mechanistic-Target Of Rapamcin) (voir Figure 7-8). Ces deux nœuds signalétiques sont au cœur d'intenses investigations du fait de leur fréquence élevée de mutations dans le cancer.

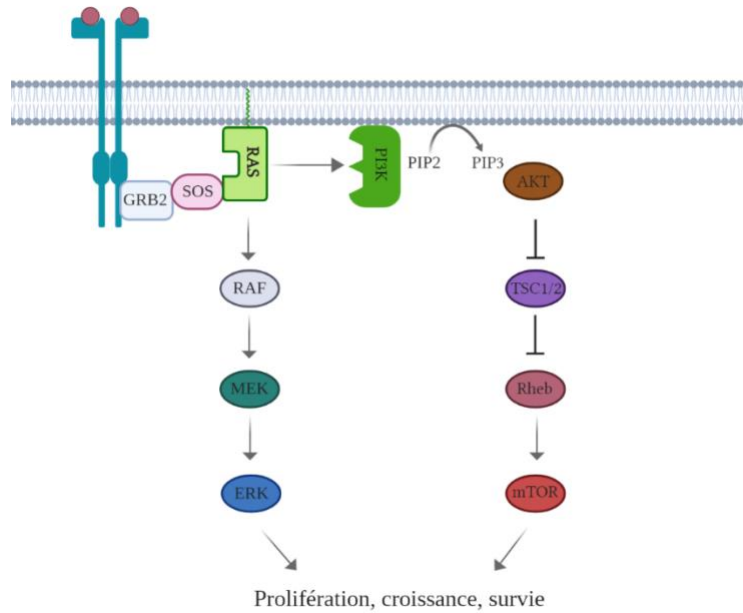


Figure 7: L'axe RAS/PI3K.

La fixation d'un ligand au RTK déclenche le recrutement et l'activation de RAS par les protéines GRB2 et SOS. RAS activé stimule les voies de signalisation des MAPKs (RAS/RAF/MEK/ERK) et de la PI3K (PI3K/AKT/mTOR). Toutes deux convergent vers la prolifération, la croissance et la survie cellulaire. © Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

4.2.2. La voie des MAPKs kinases.

4.2.2.1. Généralité

Les MAPKs sont des sérines/thréonines kinases présentes chez tous les eucaryotes, qui s'activent suite à diverses stimulations notamment par RAS (Cargnello et Roux, 2011). Chez les mammifères, les MAPKs conventionnelles comprennent les protéines ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2), les JNK 1/2/3 (c-Jun amino N-terminal Kinases 1/2/3), les isoformes p38 et la kinase ERK5 (Extracellular signal-Regulated Kinase 5) (Cargnello et Roux, 2011). Historiquement, ERK 1 et ERK 2 ont été découvertes par le constat que deux protéines aux alentours de 41 et 43 kDa étaient rapidement phosphorylées suivant l'addition des facteurs de croissance (Cargnello et Roux, 2011). ERK1 et ERK2 partagent 85% d'identité et de nombreux substrats en commun (Campbell, 2014). Ainsi, on les réfère généralement sous le même nom de ERK1/2 ou ERK (Campbell, 2014). Étant donné sa forte implication dans la prolifération, nous nous intéresserons ici

uniquement aux MAPs Kinases ERK1/2. Lorsque nous parlerons de la voie des MAPKs, cela réfère donc à la voie RAS/RAF/MEK/ERK.

4.2.2.2. Principe d'activation général de la voie RAS/RAF/MEK/ERK.

Une fois activé, RAS recrute la protéine RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) qui représente la MAP kinase kinase kinase (MAPKKK). RAF active ensuite par phosphorylation la protéine kinase kinase MEK (Mitogen-Extracellulaire Kinase) qui elle-même active la MAPK finale ERK par double phosphorylation (Maik-Rachline et al., 2019). Il existe trois isoformes de RAF (RAF-A, RAF-B et RAF-C) ainsi que deux isoformes de MEK (MEK1/MEK2 ou MEK1/2). La phosphorylation de ERK1/2 par MEK1/2 entraîne un changement de conformation qui libère son domaine signal de translocation nucléaire NTS (Nuclear Translocation Signal) et favorise sa fixation à l'importine 7 pour son déplacement dans le noyau (Maik-Rachline et al., 2019). L'importation et l'exportation de ERK1/2 entre le noyau et le cytoplasme sont importantes pour sa rencontre avec des substrats spécifiques (Maik-Rachline et al., 2019). Les cibles de ERK1/2 sont nombreuses et variées avec déjà plus de 600 substrats confirmés et environ 125 correspondants à des protéines exclusivement nucléaires (Maik-Rachline et al., 2019). Elles comprennent des facteurs de transcription, des enzymes de modification de la chromatine, mais aussi des protéines structurales et des régulateurs classiques du cycle cellulaire comme les complexes cycline/CDK (Maik-Rachline et al., 2019).

4.2.2.3. Importance de ERK1/2 dans la progression du cycle cellulaire.

Les protéines ERK1/2 présentent un état intense de phosphorylation en phases G0/G1, ce qui a rapidement orienté vers un rôle dans l'entrée du cycle cellulaire. On sait aujourd'hui que ERK1/2 a une influence importante dans la prolifération, mais son rôle exhaustif est loin d'être entièrement détaillé. Tout d'abord, ERK favorise la formation de certains complexes cyclines/CDK tels que les complexes cyclines D/CDK et cycline E/CDK. En effet, ERK1/2 induit la transcription de la cycline D1 de manière indirecte, par l'activation de facteurs de transcription comme MYC (Chambard et al., 2007). De manière intéressante, la translocation nucléaire de ERK1/2 est nécessaire pour une progression efficace du cycle cellulaire, ce qui suggère un rôle transcriptionnel important (Chambard et al., 2007). ERK1/2 est aussi nécessaire pour bloquer l'expression de gènes antiprolifératifs (Chambard et al., 2007). De plus, l'import nucléaire de CDK2 ainsi que son activation par phosphorylation de la thréonine 160 nécessite l'activité de ERK1/2 (Chambard et al., 2007). Cela favorise l'association de CDK2 avec la cycline E et l'entrée définitive dans un cycle de division. De façon plus générale, l'activité de ERK est précieuse pour la croissance cellulaire, qui représente un

prérequis à la division. ERK phosphoryle et améliore l'activité de l'enzyme carbamoyl phosphate synthétase (CPS1) impliquées dans la biosynthèse des nucléotides pyrimidiques, une étape importante pour la réplication (Chambard et al., 2007). De plus, ERK1/2 augmente la traduction protéique en favorisant la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction EIF4E (Eukaryotic translation Initiation Factor 4E) ce qui stabilise son interaction avec la coiffe des ARNm (Chambard et al., 2007).

Probablement à cause de son lien fort avec les facteurs de croissance, les fonctions du sentier RAS/RAF/MEK/ERK ont été d'avantage détaillées durant la phase G1/S. Cependant, il est clair que ce sentier joue aussi un rôle dans la transition G2/M. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de ERK rallonge la durée de la mitose et entraîne des complications dans la mise en place du fuseau mitotique (Chambard et al., 2007). À l'inverse, l'hyperactivité de ERK1/2 par la surexpression ectopique de RAS semble tout aussi dommageable pour la mitose, et entraîne souvent des défauts de ségrégation des chromosomes et la production de cellules aneuploïdes ou polyploïdes (Kamata et Pritchard, 2011). Il faut avouer que peu de mécanismes ont été clairement détaillés pour expliquer ces phénotypes. Toutefois, la kinase RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase) est un substrat de ERK1/2 qui phosphoryle la partie C-terminale de la kinase MYT1 et l'inhibe (Palmer et al., 1998). De cette manière, la suractivité de la voie RAS/RAF/MEK/ERK peut favoriser une précipitation en mitose en empêchant l'activité régulatrice de MYT1 sur la formation des complexes cycline B/CDK1. Un rôle mitotique a aussi été proposé (Mulner-Lorillon et al., 2017). Tout d'abord, ERK1/2 semble être associées aux kinétochores durant la mitose (Zecevic et al., 1998). De plus, l'activité des MAPKs est importante pour la mise en place du point de contrôle du fuseau mitotique, par un mécanisme qui ferait intervenir Aurora-B (Eves et Rosner, 2010). Un lien entre ERK1/2 et la protéine centromérique CENP-E (Centromere-Associated Protein E) a aussi été proposé. CENP-E est une protéine du kinétochore externe qui joue un rôle important dans l'attachement des microtubules aux kinétochores. Il a été montré que CENP-E est phosphorylé par ERK1/2 sur des sites importants pour son interaction avec les microtubules (Chambard et al., 2007). Pour finir, ERK1/2 phosphoryle et active les phosphatases CDC25 A, B et C, ce qui contribue à la progression en phase G1/S comme en phase G2/M (Campbell, 2014).

4.2.3. La voie de la phosphoinositide-3-kinase.

4.2.3.1. Généralités.

En parallèle à la voie des MAPKs, la voie de la phosphoinositide-3-kinase ou PI3K est une autre voie de signalisation bien caractérisée et sous contrôle de RAS (Castellano et Santos, 2011). Les phosphoinositides-3-kinases (PI3Ks) sont des kinases lipidiques hétérodimériques composées

d'une sous-unité catalytique et d'une autre à activité régulatrice (Castellano et Santos, 2011). Les PI3Ks régulent de nombreux processus cellulaires anaboliques tels que la croissance, l'apoptose, la survie cellulaire et éventuellement, la transformation tumorale (Castellano et Santos, 2011). D'ailleurs, la découverte de la PI3K remonte à 1980, là encore dans un contexte de recherche en virologie tumorale, où la PI3K était retrouvée associée avec certains oncogènes viraux (Vanhaesebroeck et al., 2012). Chez les mammifères, la famille des PI3Ks comprend trois classes principales dites de classes I, II et III. Il existe aussi plusieurs sous-unités catalytiques aux PI3K. Les sous-unités catalytiques de classe IA (p110 α , p110 β et p110 γ) qui s'associent avec la sous-unité régulatrice p85, à la différence de la classe IB composée uniquement de p110 δ . Nous nous intéresserons ici aux PI3Ks de classe IA du fait de leur forte implication dans le contrôle de la division cellulaire ainsi que dans de nombreux cancers humains (Kumar et Carrera, 2007 ; Vivanco et Sawyers, 2002). Le principal substrat de la PI3K de classe I est le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) (Vivanco et Sawyers, 2002). La PI3K phosphoryle le PIP2 et le convertit en phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate (PIP3), un phospholipide responsable de la transduction du signal (voir Figure 8).

4.2.3.2. La voie PI3K/AKT/mTOR, principe et activation.

Les PI3Ks de classe I sont activées par les RTKs de la même manière que RAS. Suite à l'activation du récepteur, la PI3K est recrutée à la membrane via la sous-unité régulatrice p85 qui contient des domaines d'homologie SH-2 (Vivanco et Sawyers, 2002). RAS peut aussi directement interagir avec la PI3K et entraîner son activation de manière indépendante de la sous-unité p85 (Castellano et Santos, 2011). Dans ces conditions, le statut RAS-GTP est indispensable à l'activation de la PI3K, qui est attribuée à des changements de conformation et un rapprochement avec ses substrats lipidiques (Castellano et Santos, 2011). Une fois active, la PI3K convertit le phospholipide PIP2 en PIP3, qui agit comme un site d'amarrage pour les protéines contenant des domaines d'homologie de la pleckstrine (-PH pour Pleckstrin Homology) comme AKT (voir Figure 8). De cette manière, la kinase AKT est recrutée à la membrane et activée par la phosphorylation de résidus critiques comme la thréonine 308 (Thr 308), par PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1), elle-même recrutée par le PIP3 (voir Figure 8). La kinase AKT dont il existe trois isoformes (AKT1, AKT2 et AKT3) est fortement associée au contrôle de la survie, de la croissance et de la prolifération (Laplanche et Sabatini, 2009). La kinase mTORC1 (Mechanistic-Target Of Rapamcin Complex 1) est une cible importante d'AKT. mTOR est une sérine/thréonine kinase de la famille des PI3Ks agissant sous deux complexes, mTOR complexe 1 (mTORC1) et mTOR complexe 2 (mTORC2) (Laplanche et Sabatini, 2012). Les deux complexes renferment la sous-unité catalytique mTOR, avec différents

partenaires protéiques importants pour la régulation et l'activation de chaque complexe. Les plus importants étant RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of mTOR) et RICTOR (RPTOR Independent Companion of mTOR complex 2), qui sont nécessaires à la formation et l'activation optimale de mTORC1 et mTORC2 respectivement (Laplante et Sabatini, 2012). On retrouve aussi des protéines adaptatrices comme mSIN1 (ou MAPKAP1 pour Mitogen-Activated Protein Kinase-Associated Protein 1) qui régule l'assemblage de mTORC2, et des régulateurs comme PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa) pour mTORC1 et mLST8 (Mammalian Lethal with SEC13 protein 8) que l'on retrouve sur les deux complexes mais qui n'est essentiel qu'à l'activité de mTORC2 (Laplante et Sabatini, 2012). La protéine DEPTOR quant à elle est un inhibiteur commun aux deux complexes (voir Figure 8) (Laplante et Sabatini, 2012). La kinase mTORC1 est activée de façon critique par la protéine GTPase Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain) sous sa forme liée au GTP, le statut GDP-GTP de Rheb étant sous contrôle de TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2), une protéine hétérodimérique activatrice de GTPase qui convertit Rheb dans sa forme inactive (Laplante et Sabatini, 2012). mTORC1 est activé indirectement par plusieurs kinases tel que AKT, ERK1/2 et même RSK1 qui phosphorylent et inhibe TSC1/2 (voir Figure 8)(Laplante et Sabatini, 2009). mTORC1 est un facteur très important pour la croissance, en stimulant à la fois la biogénèse des ARNm et des protéines (Laplante et Sabatini, 2012). Le complexe mTORC2 est activé par les facteurs de croissance mais d'une façon beaucoup plus énigmatique qui semble faire intervenir la PI3K, les ribosomes et AKT. mTORC2 entraîne l'activation maximale d'AKT déjà amorcée par PDK1, en phosphorylant un deuxième résidu critique, la sérine 473 (Ser 473)(voir Figure 8)(Laplante et Sabatini, 2012). Le complexe mTORC2 assure de cette manière l'activation indirecte de mTORC1 par AKT en réponse aux facteurs de croissance. Il semblerait aussi qu'AKT amorce l'activation de mTORC2, ce qui formerait une sorte de boucle d'activation mutuelle, bien que les détails mécanistiques restent incomplets (Saxton et Sabatini, 2017).

Enfin, il est important de mentionner le rôle capital de la phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) dans la régulation de la voie PI3K-AKT-mTOR. En effet, PTEN bloque la transmission du signal émis par la PI3K et empêche le recrutement d'AKT à la membrane en déphosphorylant les phospholipides PIP3 qui retournent alors à l'état de PIP2 (voir Figure 8) (Laplante et Sabatini, 2012).

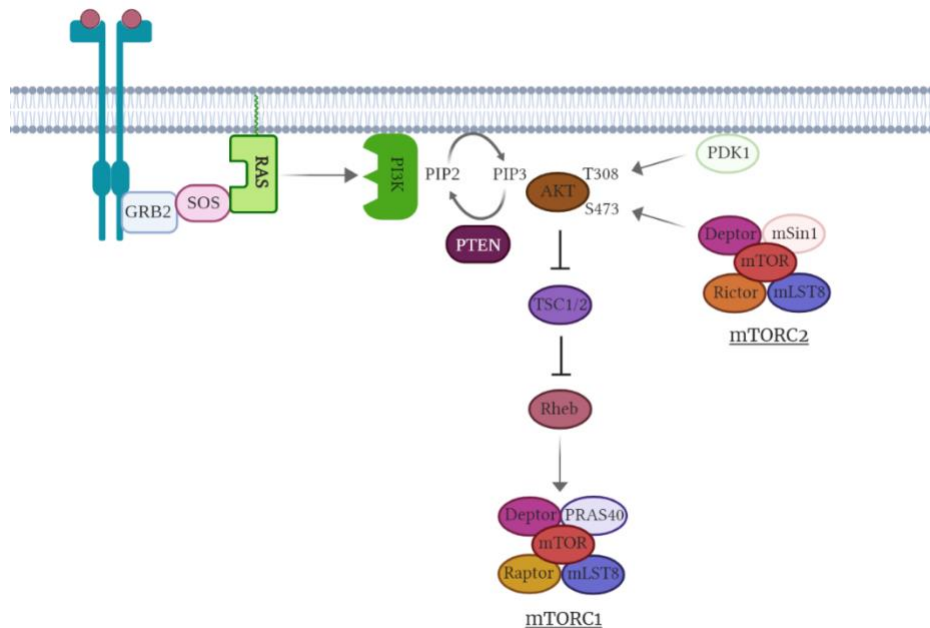


Figure 8: La voie PI3K/AKT/mTOR.

Une fois activée par RAS, la PI3K convertit le PIP2 en PIP3 ce qui permet le recrutement des kinases AKT et PDK1. PDK1 active AKT par phosphorylation sur la thréonine 308. AKT inactive ensuite TSC1/2 ce qui permet à Rheb d'activer le complexe mTORC1 composé de la sous-unité catalytique mTOR et des partenaires DEPTOR, RAPTOR, mLST8 et PRAS40. Le complexe mTORC2 est composé de la sous-unité mTOR avec les partenaires DEPTOR, RICTOR, mLST8 et mSin1. Le complexe mTORC2 active AKT au maximum en phosphorylant la thréonine 308. PTEN inhibe la voie AKT/mTORC1 en convertissant le PIP3 en PIP2. © Romain Villot. 2020. Figure réalisée à partir de BioRender.

4.2.3.3. Importance de la PI3K dans le contrôle du cycle cellulaire.

Il y a des évidences claires que la PI3K est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Chang et al., 2003 ; Kumar et Carrera, 2007). D'ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la PI3K impacte la progression en phase G1/S (García et al., 2006). La croissance, qui implique la biogénèse des matériaux de construction adéquats pour la production de deux cellules filles à partir d'une cellule mère, est un prérequis indiscutable à chaque cycle de division (García et al., 2006). Il semblerait que la PI3K orchestre la progression dans le cycle cellulaire en contrôlant à la fois la croissance et certains événements déclencheurs. Ainsi, le premier rôle de la voie PI3K/AKT/mTOR dans la régulation positive du cycle cellulaire est probablement l'activation de la croissance cellulaire par mTORC1, via son contrôle de la traduction (Laplante et Sabatini, 2009).

Au-delà, AKT semble être le principal responsable des effets de cette voie de signalisation sur le contrôle du cycle cellulaire (Chang et al., 2003 ; Kandel et al., 2002). En effet, la sur-expression d'AKT permet d'échapper à l'arrêt G2/M induit par les dommages à l'ADN ou par l'inhibition de la PI3K (Kandel et al., 2002). De plus, AKT phosphoryle et inhibe la protéine GSK3- β (Glycogène Synthétase Kinase 3 bêta) qui déstabilise des facteurs importants de la transition G1/S comme la cycline D (García et al., 2006). AKT inhibe aussi les inhibiteurs p21 et p27, par des phosphorylations ayant lieu sur leurs résidus Thr145 et Thr157/Thr198 respectivement (Katayama et al., 2005 ; Shin et al., 2002 ; Zhou et al., 2001). Ces phosphorylations entraînent une exclusion nucléaire de p21 et de p27 ce qui les éloigne des complexes cyclines/CDK (Katayama et al., 2005 ; Shin et al., 2002 ; Zhou et al., 2001). En phase G2/M, il a été bien démontré qu'AKT inactive les kinases WEE1 et MYT1, favorisant ainsi la formation des complexes cycline B/CDK1 et l'entrée en mitose (Katayama et al., 2005 ; Okumura et al., 2002). De plus, AKT est aussi impliqué dans l'inhibition de p53 en réponse aux dommages à l'ADN, là encore via l'inhibition de GSK3- β (Boehme et al., 2008). L'implication d'AKT dans la régulation du cycle cellulaire ne fait donc aucun doute.

4.2.4. Incidence de la voie RAS/PI3K dans le cancer.

L'axe signalétique RAS/PI3K est un maître régulateur de la carcinogénèse, souvent rendu hyperactif par des dérèglements divers et variés, notamment au niveau de l'activité ou de l'abondance des récepteurs membranaires. Le Récepteur au Facteur de Croissance Épidermique (EGFR pour Epidermal Growth Factor Receptor) est sur-représenté dans 30 à 85% des cancer colorectaux et a une activité défaillante dans 80% des tumeurs solides (Lièvre et Laurent-Puig, 2010 ; Saryeddine et al., 2016). De plus, on estime que 27% de tous les cancers présentent des mutations dans un des trois gènes RAS ce qui en fait une cible majeure en cancérologie (Hobbs et al., 2016). Les mutations dans *K-RAS* sont largement plus fréquentes avec 85% de l'ensemble d'entre elles, suivies par *N-RAS* à 11%, *H-RAS* étant le moins muté avec 4% seulement (Hobbs et al., 2016). De manière assez spectaculaire, 98% de toutes les mutations ont lieu dans trois résidus dits « hots spots », avec 83% pour la glycine 12 (G12). Ce résidu est bien souvent muté en valine, ce qui bloque l'activité hydrolytique GTPasique et entraîne une accumulation de complexes actifs RAS-GTP (Hobbs et al., 2016). *B-RAF* est lui aussi muté dans 8% des cancers. Cependant, les mutations dans les autres composantes de la voie des MAPKs comme ERK sont plus rares (Sanchez-Vega et al., 2018).

La voie PI3K/AKT/mTOR est aussi fréquemment altérée dans le cancer. La perte de PTEN qui induit une activation aberrante de la voie PI3K/AKT/mTOR est extrêmement fréquente dans les cancers humains (Sanchez-Vega et al., 2018). On observe aussi des amplifications d'AKT et de la sous-unité p110 de la PI3K (Vivanco et Sawyers, 2002). Une forme tronquée de la sous-unité p85 qui

induit une activité constitutive de la PI3K a aussi été identifiée dans une lignée cellulaire lymphoïde transformée (Jimenez et al., 1998). Ainsi, étant donné que mTORC1 se retrouve en aval d'autant de proto-oncogènes, il n'est pas étonnant de constater que son hyperactivation est observée dans de nombreux cancers (Saxton et Sabatini, 2017). D'un point de vue clinique, la suractivité du sentier RAS comme de la PI3K est associée à un mauvais pronostic et à des tumeurs particulièrement agressives. L'axe RAS/PI3K, probablement par son influence sur le cycle cellulaire, est aussi fortement associé à l'instabilité chromosomique (Kamata et Pritchard, 2011). Dans un contexte tumoral ou les points de contrôle du cycle sont atténués voir absents, l'instabilité chromosomique apporte une source continue de mutations, favorisant l'adaptation des tumeurs résistantes aux tentatives de traitements de chimiothérapie, ce qui les rend particulièrement sévères (Bakhoun et Cantley, 2018).

5. Arrêter de proliférer temporairement ou pour toujours, une règle ignorée des cellules cancéreuses.

5.1. Trois différents arrêts du cycle cellulaire.

La prolifération cellulaire, chez les métazoaires tout comme chez nos ancêtres unicellulaires, ne peut avoir lieu de façon continue. Au-delà des poses transitoires induites par les points de contrôle du cycle cellulaire (voir partie 3), des mécanismes d'arrêt prolongé voir définitif du cycle sont nécessaires pour i) stopper la croissance infinie de l'individu en produisant des cellules différenciées non prolifératives, par la différenciation, ii) maintenir un panel de cellules souches pour le renouvellement bien organisé des tissus, via la quiescence et iii) empêcher la prolifération cellulaire à partir d'une cellule dont le contenu génomique est altéré, par la sénescence. La quiescence est une pose dans la prolifération. Il s'agit d'un processus physiologique mis en place à la suite du retrait des nutriments ou des facteurs de croissance, mais où la cellule garde son potentiel prolifératif et peut rentrer dans un cycle de division à tout moment. Les cellules différenciées et sénescents partagent la caractéristique d'être dépourvues de potentiel prolifératif et d'être arrêtées irréversiblement dans leur cycle cellulaire. Néanmoins, à l'inverse de la différenciation qui aboutit à la production de cellules spécialisées, la sénescence est un processus dégénératif mis en place en réponse au stress. La sénescence évite la prolifération des cellules devenues trop âgées, ou ayant subi des dommages à l'ADN. La sénescence peut aussi être induite lorsqu'une activation aberrante des voies de signalisation prolifératives est perçue par la cellule. En somme, c'est une barrière importante à la transformation tumorale. Bien sûr, les mécanismes impliqués dans la mise en place et/ou le maintien

de la sénescence sont désassemblés dans les cellules cancéreuses, qui continuent de proliférer malgré un haut niveau de stress.

5.2. *La sénescence cellulaire.*

5.2.1. *Définition.*

La sénescence cellulaire a été documentée pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead (Hayflick et Moorhead, 1961). En cultivant des cellules primaires issues d'explants de tissus humains, les auteurs ont constaté que la prolifération ralentissait graduellement jusqu'à atteindre une barrière et s'arrêter complètement, après un certain nombre de doublements des cellules (Hayflick et Moorhead, 1961). Alors baptisée « limite de Hayflick », ce fut la première évidence du vieillissement au niveau cellulaire, d'où le terme sénescence attribué, qui descend du mot latin « senex » signifiant « vieux » (Gorgoulis et al., 2019). La sénescence cellulaire a depuis été intensivement étudiée, et on la définit aujourd'hui comme étant un état cellulaire qui se déclenche en réponse au stress et certains processus physiologiques. On caractérise la sénescence par un arrêt prolongé et généralement irréversible du cycle cellulaire, un phénotype sécrétoire, un métabolisme altéré et un profil transcriptionnel spécifique. On distingue deux types de sénescence : la sénescence répllicative ou physiologique, étroitement liée à l'âge des cellules, et la sénescence prématurée qui survient avant l'heure en raison d'un stress cellulaire. La sénescence n'est donc pas strictement liée au vieillissement (Gorgoulis et al., 2019). La présence de cellules sénescents in vivo a été mise en évidence dans différents modèles ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'un phénomène exclusif aux cellules en culture. Par ailleurs, c'est un processus central mais très controversé dans la tumorigénèse. Bien qu'il soit indéniable que la sénescence joue un rôle de barrière dans les premières étapes de la transformation, de plus en plus d'évidences pointent du doigt des facettes beaucoup plus sombres des cellules sénescents au sein des tumeurs établies, notamment à cause de leurs fonctions sécrétoires (Coppé et al., 2010).

5.2.2. *Les grandes caractéristiques de la sénescence.*

En plus d'être irréversiblement arrêtées dans le cycle cellulaire, les cellules sénescents ont des caractéristiques morphologiques, métaboliques, sécrétoires et transcriptionnelles, qui les différencient largement des cellules quiescentes (Gorgoulis et al., 2019). L'activité des axes p16/Rb et p53/p21 est très importante pour l'établissement de la sénescence. Les cellules sénescents sont dans un état de stress intense, et présentent des dommages macromoléculaires importants qui les vouent à une mort certaine. Pourtant, ces cellules s'acharnent à rester en vie en inhibant l'apoptose et

en gardant un métabolisme actif, ce qui leur vaut la qualification de cellules « zombies » (Scudellari, 2017).

5.2.2.1. Caractéristiques morphologiques.

Les cellules sénescentes en culture subissent des changements morphologiques dramatiques caractérisés par une forme élargie et écrasée (voir Figure 9) (Herranz et Gil, 2018). L'origine de ces changements n'est pas bien comprise mais semble associée au stress protéotoxique intense que rencontrent les cellules sénescentes. La présence de ponts cytoplasmiques a aussi été mise en évidence et permettrait aux cellules sénescents de communiquer et d'échanger directement des protéines intracellulaires (Biran et al., 2015).

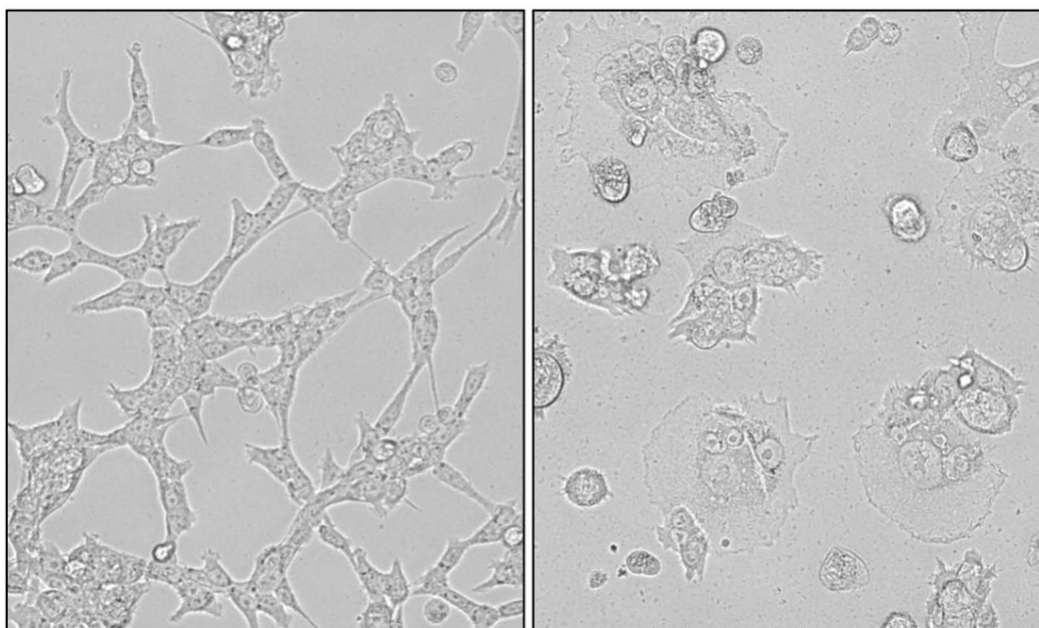


Figure 9: Caractéristiques morphologiques des cellules sénescents.

À gauche: cellules HCT116 normales. À droite: cellules HCT116 sénescents, après un traitement de 4 jours à la doxorubicine (une nuit d'exposition à 0.1 µM). ©Romain Villot, 2020.

5.2.2.2. Caractéristiques métaboliques et sécrétoires.

La sénescence cellulaire est caractérisée par un métabolisme énergétique élevé, avec une augmentation de la glycolyse et de la production d'ATP par les mitochondries (Herranz et Gil, 2018). Des voies de signalisation sensibles aux facteurs de croissance telle que la voie PI3K/AKT/mTOR sont très actives dans les cellules sénescents, une grande différence avec les cellules quiescentes où elles sont globalement éteintes. D'ailleurs, il semble que l'activité de la voie PI3K/AKT/mTOR dans

un contexte de cellules arrêtées dans le cycle cellulaire soit nécessaire pour déclencher la conversion en cellules sénescentes, aussi appelée géroconversion (Blagosklonny, 2014).

De plus, les cellules sénescentes ont des fonctions sécrétoires et libèrent plus de 40 molécules différentes, incluant des facteurs solubles de signalisation intercellulaires (Davalos et al., 2010). On y trouve des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL6), le Tumor Necrosis Factor (TNF) et le Facteur de stimulation des colonies CSF (Colony Stimulating Factor), mais aussi des facteurs de croissance comme les protéines de type IGFBP (Insulin Growth Factor Binding Protein) (Gorgoulis et al., 2019). On appelle cela le « phénotype sécrétoire associé à la sénescence » (PSAS) (Gorgoulis et al., 2019). La fonction première du PSAS est de recruter les cellules immunitaires au niveau des cellules sénescentes afin de les éliminer, ce qui entraîne en même temps une inflammation chronique. Le PSAS contribue au renforcement de la sénescence de façon autocrine et paracrine (Gorgoulis et al., 2019). L'augmentation du métabolisme demande un renouvellement rapide des processus anaboliques et cataboliques, qui se traduit par une augmentation en nombres et en tailles des lysosomes. L'activité de la β -galactosidase lysosomale à pH 6 est liée à l'augmentation en tailles des lysosomes et constitue le marqueur le plus utilisé pour identifier des cellules sénescentes (Rodier et Campisi, 2011).

5.2.2.3. Caractéristiques transcriptionnelles, chromatinienne et structurales.

Le profil transcriptionnel des cellules sénescentes est très dynamique et spécifique du type cellulaire (Hernandez-Segura et al., 2017). Il y a une forte hétérogénéité parmi les différentes formes de sénescence si bien que très peu de cibles peuvent être utilisées comme marqueur transcriptionnel universel (Hernandez-Segura et al., 2017).

L'activité des suppresseurs de tumeurs principaux p53 et pRB, qui sont aussi impliqués dans la quiescence, entraînent des changements transcriptionnels majeurs. Des hauts niveaux persistants de p16 ont pour effet de bloquer pRB dans son état non-phosphorylé, ce qui induit une chromatine répressive (Rodier et Campisi, 2011). L'expression de p16 est assez complexe et dépend aussi de changements dans la structure chromatinienne qui seront discutés ultérieurement (voir partie 5.2.3.2.2) (Criscione et al., 2016). On observe dans les cellules sénescentes, la formation visible de domaines d'hétérochromatine appelés foyers d'hétérochromatines associés à la sénescence (FHAS) (Rodier et Campisi, 2011). Ces régions d'hétérochromatines contribuent à la sortie du cycle cellulaire en réprimant des gènes prolifératifs comme la cycline A et autres cibles des facteurs de transcription E2Fs (Narita et al., 2003; Tu et al., 2013). Au-delà de *p21*, le suppresseur de tumeurs p53 contrôle la transcription de plusieurs autres marqueurs spécifiques de la sénescence (Qian et Chen, 2010). Les

plus connus étant *PML* (*Promyelocytic Leukemia Protein*), *PAI1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) et *DEC1* (*Deleted in Esophageal Cancer 1*) (Qian et Chen, 2010).

D'un point de vue générale, les cellules sénescences rencontrent des changements épigénomiques drastiques (Campisi, 2013). On constate une redistribution des marques d'histones répressives telles que H3K9me3 aux niveaux de gènes prolifératifs tandis que les gènes codants des facteurs du phénotype sécrétoire (PSAS) montrent un enrichissement en marques épigénétiques activatrices H3K27 acétylées (Gorgoulis et al., 2019). Le complexe SWI/SNF joue un rôle important dans l'établissement de la sénescence par son activité de remodelage de la chromatine (Tu et al., 2013). L'interaction de pRB avec la sous-unité catalytique BRG1 du complexe SWI/SNF augmente durant la sénescence et est importante pour la formation de foyers d'hétérochromatine (Tu et al., 2013). De plus, SWI/SNF stimule la transcription de *p16* et de *p21* en s'associant directement à leurs promoteurs (Tu et al., 2013).

Enfin, le centromère des cellules sénescences rencontre aussi des altérations structurales majeures (Criscione et al., 2016). Le centromère est un compartiment du chromosome particulièrement important qui assure la liaison des chromatides sœurs en interphase et leur ségrégation durant la mitose (McKinley et Cheeseman, 2016). Le centromère est une région d'hétérochromatine caractérisée par des séquences d'ADN répétées, normalement réprimées par des mécanismes épigénétiques (McKinley et Cheeseman, 2016). Dans les cellules sénescences, on observe une relaxation générale de l'ADN centromérique (Criscione et al., 2016). Même si cela n'est pas encore clair, la dissolution de l'hétérochromatine centromérique peut affecter des fonctions essentielles du centromère et participer au maintien de la sénescence (Criscione et al., 2016).

5.2.2.4. Inhibition de l'apoptose.

La sénescence et la mort cellulaire par apoptose sont deux phénomènes plutôt antagonistes. Les cellules sénescences ont généralement tendance à repousser l'apoptose en sur-exprimant des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (Gorgoulis et al., 2019). De plus, l'inhibiteur du cycle p21 qui est fortement induit dans la sénescence est connu pour interférer avec l'apoptose par divers moyens (Abbas et Dutta, 2009). Il faut aussi rappeler que le sentier PI3K/AKT/mTOR a une forte activité dans les cellules sénescences, et que cette voie de signalisation régule positivement la survie cellulaire (Hung et al., 2012 ; Li et al., 2002).

5.2.3. *Les différentes formes de sénescence.*

5.2.3.1. La sénescence répllicative.

On sait dorénavant que la limite de Hayflick est due au raccourcissement progressif des télomères ayant lieu à chaque doublement, et qui aboutit à ce qu'on appelle la sénescence répllicative (Kuilman et al., 2010). Les télomères sont des structures présentes aux extrémités des chromosomes, composées d'ADN et d'une coiffe protéique (Morgan, 2007). À chaque cycle cellulaire, l'ADN polymérase manque de répliquer complètement l'ADN à l'extrémité des chromosomes (Morgan, 2007). La télomérase est l'enzyme responsable du maintien des télomères, mais celle-ci n'est pas exprimée dans la plupart des cellules primaires (Morgan, 2007). Les divisions successives entraînent alors une dégénérescence progressive des télomères, ce qui finit par déclencher la réponse aux dommages à l'ADN (Kuilman et al., 2010). Les voies de transduction classiques ATM/ATR/CHK1/CHK2 sont activées dans les cellules sénescents et amènent à un arrêt du cycle cellulaire notamment via les suppresseurs de tumeurs pRB et p53 (Kuilman et al., 2010). Il a été démontré que la surexpression ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) permet d'éviter la sénescence répllicative, ce qui souligne l'importance des télomères qui en somme, fonctionnent comme des horloges biologiques (Kuilman et al., 2010).

Il fut un moment supposé que la limite de Hayflick était un artefact dû aux difficultés que pouvaient rencontrer les cellules pour s'adapter aux conditions stressantes de culture cellulaire. En effet, les cellules murines qui possèdent des télomères plus longs et expriment généralement bien la télomérase rentrent elles aussi en sénescence parfois plus rapidement que les cellules humaines (Morgan, 2007). Afin de clôturer ce débat, Ramirez et ses collaborateurs ont cultivé des kératinocytes dans des boîtes préalablement tapissées par une couche de fibroblastes, pour se rapprocher au mieux des conditions physiologiques de l'organisme (Morgan, 2007 ; Ramirez et al., 2001). Les auteurs ont constaté que la culture sur couche nourricière permettait d'allonger significativement la limite de Hayflick comparé aux cellules contrôles restées dans des boîtes en plastiques (Morgan, 2007; Ramirez et al., 2001). Néanmoins, la surexpression de la télomérase dans les cellules cultivées sur couche nourricière leur permet de contourner totalement l'arrêt de la prolifération (Morgan, 2007; Ramirez et al., 2001). Ces expériences démontrent que les télomères sont la source principale de sénescence dans ces conditions de culture mais qu'un facteur de stress intervient de façon importante. La limite de Hayflick qui correspond au maximum répliatif imposé par l'âge de la cellule relatif à ces télomères n'est donc pas évidente à déterminer. La sénescence peut en effet être induite « prématurément » par divers facteurs de stress.

5.2.3.2. La sénescence prématurée.

La sénescence prématurée regroupe l'ensemble des phénomènes de sénescence ou l'attrition des télomères ne peut pas être mise en cause. La sénescence prématurée est déclenchée par des dommages à l'ADN persistants, ainsi que l'activation aberrante de certaines voies prolifératives et/ou anaboliques comme l'axe RAS/PI3K (voir partie 5.2.3.2.1 et 5.2.3.2.2).

5.2.3.2.1. *La sénescence induite par les dommages à l'ADN.*

La sénescence prématurée peut être déclenchée par l'induction de dommages à l'ADN non-téломériques (Nakamura et al., 2008; te Poele et al., 2002). D'ailleurs, c'est sur ce principe que se base la chimiothérapie, qui utilise des drogues comme les inhibiteurs de topoisomérases ou des traitements physiques comme les radiations ionisantes pour induire des dommages à l'ADN (Campisi, 2013). Les cassures double brins sont des inducteurs forts de sénescence, étant donné qu'un petit nombre de lésions non réparées est suffisant pour l'arrêt de la prolifération (Di Leonardo et al., 1994). Tout comme dans la sénescence répllicative, la réponse classique aux dommages à l'ADN, ATM/ATR/CHK1/CHK2, converge vers l'activation de p53 qui entraîne l'arrêt du cycle via p21 (Di Leonardo et al., 1994). L'activation persistante de l'axe ATM/ATR/CHK1/CHK2 conduit alors à une entrée en sénescence (Campisi, 2013). Toutes les lésions à l'ADN, notamment les oxydations de bases azotées, peuvent culminer vers des dommages plus graves et des cassures doubles brins qui déclenchent la sénescence cellulaire (Campisi, 2013).

5.2.3.2.2. *La sénescence induite par les oncogènes.*

La suractivité de facteurs mitogènes comme RAS, MYC ou AKT ou encore la perte de suppresseurs de tumeurs comme PTEN n'accélèrent que très transitoirement la prolifération et induit rapidement une entrée en sénescence. Les cellules de mammifères sont dotées d'un système de contrôle qui leur permet de percevoir les signaux mitogéniques en excès et d'y répondre par un arrêt complet du cycle cellulaire afin d'éviter la transformation tumorale. On appelle cela la réponse par hyperprolifération à une perturbation, ou point de contrôle oncogénique (Morgan, 2007).

La suractivité de RAS dans des cellules primaires induit du stress génotoxique et active les effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (DiMauro et David, 2010). Cela peut être expliqué par l'emballement générale provoqué par la surstimulation mitogénique qui mène rapidement à des dégâts aussi bien lors de la répllication que durant la mitose (Kuilman et al., 2010; Mallette et Ferbeyre, 2007). D'ailleurs, des foyers d'ADN endommagé sont clairement visibles dans les cellules qui rencontrent une sénescence induite par les oncogènes (Qian et Chen, 2010). De plus, les cellules exprimant une forme oncogénique de RAS présentent des hauts niveaux d'espèces réactives à

l'oxygène, et ceux-ci sont connus pour induire des dommages à l'ADN (Malette et Ferbeyre, 2007). Dans ce sens, il a été démontré que la déplétion de composants de la réponse aux dommages à l'ADN permet de limiter la sénescence induite par RAS, de même que la diminution des espèces réactives à l'oxygène en cultivant les cellules dans un environnement pauvre en oxygène (Qian et Chen, 2010).

Le stress génotoxique est donc sans aucun doute une cause importante de la sénescence induite par les oncogènes, mais dans certains cas, l'entrée en sénescence semble précéder tout signe de dommages à l'ADN (Kuilman et al., 2010). Par exemple, RAS oncogénique conduit à l'accumulation des inhibiteurs p16^{INK4A} et p19^{ARF}. Le dernier, p19^{ARF} ou ARF, se fixe à MDM2 et inhibe son activité d'ubiquitine ligase, favorisant ainsi la stabilisation de p53 (Morgan, 2007). Suite à un épissage alternatif, les protéines p16 et ARF sont produites à partir d'un même gène au locus *INK4-ARF* (Sherr, 2012). Le stress oncogénique stimule progressivement l'expression du gène *INK4-ARF* en modifiant la chromatine environnante, par des mécanismes encore assez obscures (Sherr, 2012). Notamment, une forte activité de RAS affecte la liaison à l'ADN de la protéine du complexe polycomb BMI1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus Integration site 1), un facteur de remodelage de la chromatine qui réprime la transcription du gène *INK4-ARF* (DiMauro et David, 2010). RAS favorise aussi la déméthylation du locus *INK4-ARF* par la réduction de la méthyltransférase EZH2 (Enhancer Of Zeste Homologue 2) et l'augmentation de la déméthylase JMJD3 (Jumonji Domain containing 3) (DiMauro et David, 2010). L'accumulation progressive de p16 et ARF amorce l'arrêt du cycle cellulaire en stabilisant ces deux effecteurs principaux, pRB et p53.

De plus, un nouveau paradigme appelé dégradation de protéines associées à la sénescence (DPAS) émerge depuis peu de temps dans le champ de la sénescence cellulaire (Deschênes-Simard et al., 2013, 2014; Ferbeyre, 2018). En cas d'activité aberrante de RAS, de nombreuses protéines en aval sont phosphorylées sur des motifs appelés degrons. Plusieurs systèmes d'ubiquitines ligases reconnaissent les degrons phosphorylés et les adressent vers la dégradation protéasomale (Ferbeyre, 2018). Par des expériences de blocages du protéasome, Deschênes-Simard et ses collaborateurs ont démontré que de nombreuses protéines importantes pour la prolifération et la viabilité cellulaire en générale sont fortement phosphorylées et dégradées dans les cellules sénescents qui sur-expriment RAS (Deschênes-Simard et al., 2014). Cela inclue aussi bien des facteurs de transcription importants pour la réplication comme MYC, que des enzymes anti oxydantes du type SOD (Superoxyde Dismutase) qui limitent normalement la quantité d'espèces réactives à l'oxygène (Deschênes-Simard et al., 2014).

Un dernier exemple d'autodestruction induite par l'activité oncogénique de RAS fait intervenir le suppresseur de tumeur BRCA1. BRCA1 joue un rôle central dans la réparation des cassures double brins par la recombinaison homologue et interagit avec la protéine BRIP1 (BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1) pour une fixation stable à la chromatine. Il a été démontré avec élégance qu'une activité oncogénique de RAS entraîne la répression transcriptionnelle de BRIP1, ayant pour cause une dissociation de BRCA1 de la chromatine (Tu et al., 2011). Cela mène à une baisse d'efficacité de la réparation par BRCA1 et une accumulation de dommages à l'ADN (Tu et al., 2011). Par ces processus, la cellule induit sa propre autodestruction en réponse à l'activité oncogénique de RAS, et scelle son destin en arrivant dans un état où toute reprise de la prolifération est rendue impossible.

5.2.4. *Les mécanismes de contournement de la sénescence.*

Par définition, les cellules sénescents sont en dehors du cycle cellulaire et perdent toute capacité à reprendre la prolifération. Ce concept est valable « *ceteris paribus* », à savoir si les choses restent égales par ailleurs. La sénescence cellulaire peut en effet être renversée, soit par l'interruption de composants clés de sa mise en place, soit par le maintien de mécanismes normalement bloqués. L'inactivation de pRB et p53 par génie génétique ou avec les protéines virales oncogéniques E7 et E6 permet de contourner du moins partiellement la sénescence dans divers modèles expérimentaux (Bischof et al., 2005; DeFilippis et al., 2003; Goodwin et al., 2000). Il semblerait qu'il existe une échelle de profondeur dans la sénescence allant d'une sénescence dite légère à profonde et qui corrèle avec le niveau d'expression de p16 et p53 (Lee et Schmitt, 2019). Récemment, une étude a d'ailleurs démontré que de simples fluctuations dans l'activité de p53 permet d'éviter l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par des dommages à l'ADN (Reyes et al., 2018). Bien sûr, l'évasion de la sénescence dépend du type de stress qui la met en place. Comme nous l'avons abordé précédemment, la sénescence répllicative peut être spécifiquement prévenue par la surexpression de la télomérase (voir partie 5.2.3.1) (Ramirez et al., 2001). C'est aussi le cas pour certaines enzymes de remodelage de la chromatine comme la déméthylase JMJD2C (Jumonji Domain 2C), ou des facteurs de transcription comme PATZ1 (POZ-, AT hook-, and Zinc finger-containing protein 1) (Cho et al., 2012; Lee et Schmitt, 2019). PATZ1 est normalement réduit dans les cellules sénescents. De manière intéressante, le maintien de certaines cibles de la dégradation de protéines associée à la sénescence comme MYC aide à contourner la sénescence cellulaire, tout comme la sur expression de BRIP1 dans la sénescence induite par les oncogènes (voir partie 5.2.3.2.2) (Deschênes-Simard et al., 2014).

Enfin, l'inhibition de la voie mTOR contribue à l'évasion de la sénescence (Demidenko et Blagosklonny, 2008). Cela semble logique étant donné qu'une activité soutenue des voies sensibles

aux facteurs de croissance contribue au caractère irréparable des cellules sénescents (Demidenko et Blagosklonny, 2008).

5.2.5. *La sénescence cellulaire dans la carcinogénèse, une épée à double tranchant.*

En bloquant irréversiblement la prolifération des cellules endommagées, la sénescence cellulaire met une barrière importante à la transformation tumorale. Les cellules sénescents sont abondantes dans les lésions néoplastiques pré-malignes et les tumeurs ayant subies un traitement chimiothérapique, tandis qu'elles sont rares dans les tumeurs malignes établies (Collado et Serrano, 2006). De plus, l'inactivation des acteurs clés de la sénescence comme p16 et p53 favorise le développement de cancers chez les mammifères (Sherr, 2012). Ainsi, il n'y a pas vraiment de doutes sur le fait que la sénescence joue initialement un rôle positif dans la suppression tumorale. Cependant, il y a des évidences claires que la présence de cellules sénescents dans un contexte de tumeur établit peut au contraire avantager la progression et l'agressivité du cancer, en raison du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (Campisi, 2013 ; Yang et al., 2017). Bien que plusieurs facteurs du PSAS comme IL-6 et IL-8 contribuent à renforcer la sénescence, les cellules sénescents peuvent promouvoir certaines caractéristiques malignes comme la prolifération et la migration (Davalos et al., 2010). En effet, des expériences de xénogreffes chez la souris montrent que la co-injection de cellules sénescents avec des cellules cancéreuses stimulent significativement la propagation du cancer et l'angiogénèse, un processus clé de la carcinogénèse qui favorise le développement de nouveaux vaisseaux sanguins pour l'alimentation de la tumeur (Campisi, 2013 ; Davalos et al., 2010). Un composant clé du PSAS pour l'angiogénèse est le facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Campisi, 2013).

Tant qu'elles restent sénescents, les cellules ne prolifèrent pas. Cependant, elles ne meurent pas non plus car les voies qui déclenchent l'apoptose y sont inhibées (voir partie 5.2.2.4). Les dommages génomiques qui s'accumulent dans les cellules sénescents risquent à tout moment d'inactiver un ou plusieurs mécanismes importants pour maintenir l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, les cellules sénescents survivent dans des conditions de stress intense, avec une haute activité oncogénique. Il y a alors de fortes probabilités pour que des clones issus de cellules sénescents ayant repris la prolifération soient particulièrement agressifs et résistants (Yang et al., 2017).

Ayant pris conscience des cotés obscurs de la sénescence, les stratégies actuelles en cancérologie se portent de plus en plus vers la thérapie sénolytique, qui vise à éliminer les cellules sénescents, par exemple après un traitement de chimiothérapie (van Deursen, 2019 ; Scudellari, 2017).

5.2.6 *Origines évolutives supposées de la sénescence cellulaire.*

Bien que la sénescence cellulaire soit une barrière non négligeable à la carcinogénèse, son origine évolutive peut difficilement être rapportée à ce concept. Pour commencer, l'apoptose est un moyen tout aussi efficace que la sénescence cellulaire pour exclure définitivement une cellule endommagée. De plus, il est maintenant clair que la sénescence cellulaire joue des rôles clés dans d'autres processus physiologiques comme la réparation des tissus et l'embryogenèse (Kowald et al., 2020 ; Muñoz-Espín et al., 2013 ; Rhinn et al., 2019). En effet, les cellules sénescents stimulent le recrutement des cellules immunitaires pour augmenter le signal de guérison en cas de blessures, et d'autre part, des cellules aux caractéristiques sénescents ont été retrouvées dans des embryons d'organismes très différents comme l'humain, la grenouille, le poisson zèbre et le poulet (Rhinn et al., 2019). Il a été montré chez la souris que la sénescence cellulaire est impliquée dans le remodelage de certaines structures tissulaires au cours du développement embryonnaire, en assurant le recrutement des cellules immunitaires (Muñoz-Espín et al., 2013). Les auteurs supposent que dans ce contexte, la sénescence est plus efficace pour le remodelage des tissus que l'apoptose qui ne fait pas intervenir de facteurs pro-inflammatoires (Muñoz-Espín et al., 2013). L'inhibiteur du cycle cellulaire p21 a été associé à la sénescence développementale et les animaux dépourvus de p21 présentent de légers défauts de développement (Muñoz-Espín et al., 2013 ; Rhinn et al., 2019).

Ainsi, il semble plus probable que la sénescence cellulaire trouve ces racines évolutives dans ces concepts plutôt qu'à titre de barrière à la transformation tumorale, qui intervient généralement tard chez les animaux disposant d'une longévité assez longue. Par ailleurs, l'accumulation des cellules sénescents est délétère et participe au vieillissement en générale ainsi qu'à plusieurs pathologies comme l'athérosclérose ou la maladie d'Alzheimer (Kowald et al., 2020). Comme l'ont proposé certains auteurs, l'émergence de la sénescence cellulaire rentre dans un cadre de pléiotropie antagoniste, un concept évolutif qui définit la sélection d'un caractère « délétère » car il confère un avantage au développement ou à la vie des individus dans leur jeune âge (Kowald et al., 2020).

Pour résumer, la sénescence cellulaire a possiblement évolué chez les métazoaires en jouant des rôles importants dans la réparation des tissus et l'embryogenèse. Dans la vie des individus, un équilibre doit ensuite exister entre le bénéfice apporté pour contrer la carcinogénèse, et les effets délétères associés à l'accumulation des cellules sénescents.

6. Conclusion.

Avec le développement des animaux supérieurs et l'émergence d'organismes plus complexes, le cancer est devenu un adversaire de taille qui surgit lorsque l'homéostasie générale est perdue. On sait aujourd'hui que l'âge est un facteur de risque important du cancer, ce qui en fait l'une des maladies les plus inquiétantes de notre ère à la vue du vieillissement de la population. Le développement du cancer implique un grand nombre d'altérations, notamment au niveau des mécanismes qui régulent normalement la croissance et la prolifération cellulaire. Les voies oncogéniques telles que l'axe RAS/PI3K sont activées par les facteurs de croissance et sont souvent mutées dans le cancer car elles apportent un avantage prolifératif important en contrôlant de nombreux processus du cycle cellulaire. Récemment, il a été démontré que RAS régit la géométrie des cellules en mitose (Matthews et al., 2020). En observant les cellules sur des gels rigides, les auteurs ont démontré que la division cellulaire en condition de confinement était facilitée par une activation soutenue de RAS (Matthews et al., 2020). Cela suggère un avantage prolifératif supplémentaire aux cellules ayant une forte activité de RAS, en facilitant la mitose au sein de masses tumorales généralement denses (Matthews et al., 2020).

De plus, les cellules normales sont dotées d'un système de contrôle qui perçoit l'activité de ces voies de signalisation et arrête la prolifération en cas de dérégulation oncogénique. Ces systèmes de contrôles sont d'une importance clé pour comprendre les défaillances qui mènent au cancer. En effet, le stress cellulaire induit par la suractivité des voies prolifératives comme l'axe RAS/PI3K entraîne normalement la sénescence cellulaire qui par définition, est un arrêt irréversible du cycle et une barrière à la transformation cellulaire. Les cellules cancéreuses désassemblent les mécanismes de la sénescence et continuent de proliférer. Les événements moléculaires par lesquels l'axe RAS/PI3K contrôle à la fois positivement le cycle cellulaire et induit la sénescence ne sont pas clairs, ce qui complique son rôle dans le cancer. De manière générale, la signalisation des facteurs de croissance et le contrôle du cycle cellulaire sont étroitement liés, mais il existe trop peu de détails mécanistiques qui permettent clairement de les connecter ensemble. Il sera donc important à l'avenir d'étudier et d'identifier d'avantage d'effecteurs de l'axe RAS/PI3K.

Problématique et hypothèse de recherche.

De manière générale, la signalisation des facteurs de croissance sous contrôle de l'axe RAS/PI3K et le caractère oscillatoire du cycle cellulaire sont, indépendamment, bien caractérisés. On sait que ces deux concepts sont interdépendants et subissent des altérations dramatiques dans le cancer. Une vaste majorité des cancers sont porteurs de mutations dans au moins un des composants de l'axe RAS/PI3K, et la dérégulation du cycle cellulaire est une caractéristique indéniable du cancer. Pour autant, il existe trop peu de détails mécanistiques qui permettent de connecter cette voie de signalisation avec le cycle cellulaire. Nous pensons que l'identification de nouveaux effecteurs de cet axe est primordiale pour comprendre son rôle dans la prolifération et dans le développement du cancer. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est l'identification et la caractérisation d'une nouvelle cible protéique de la voie RAS/PI3K, impliquée dans le contrôle de la prolifération. Notre protéine identifiée pourra, par la suite, devenir une cible potentielle en cancérologie.

Objectifs spécifiques.

Les objectifs de cette présente étude portent sur l'identification et la caractérisation de cible(s) protéique(s) sous contrôle de la voie RAS/PI3K, potentiellement impliquée(s) dans la régulation de la prolifération cellulaire et à plus large échelle, dans le développement tumoral.

CHAPITRE 1

ZNF768 LINKS ONCOGENIC RAS TO CELLULAR SENESENCE

Romain Villot^{1,2}, Audrey Poirier^{1,2}, Inan Bakan^{1,2}, Karine Boulay^{3,4}, Erlinda Fernández^{3,4}, Romain Devillers^{1,2}, Luciano Gama-Braga^{2,5}, Andréanne Gagné^{1,2}, Jean-Sébastien Bérubé^{1,2}, Jean-Christophe Bérubé^{1,2}, Yan Coulombe^{2,6}, Michèle Orain^{1,2}, Yves Gélinas^{1,2}, Stéphane Gobeil⁵, Yohan Bossé^{1,2}, Jean-Yves Masson^{2,6,7,8}, Sabine Elowe^{2,5,6}, Steve Bilodeau^{2,6,7,8}, Venkata Manem¹, Philippe Joubert^{1,2}, Frédérick A. Mallette^{3,4} and Mathieu Laplante^{1,2} *

¹ Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (CRIUCPQ), Faculté de Médecine, Université Laval, 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5

² Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Université Laval, 9 rue McMahon, Québec, QC, Canada, G1R 3S3

³ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, H1T 2M4,

⁴ Department of Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, H1T 2M4

⁵ Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, 2705 Boulevard Laurier, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

⁶ Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Axe Oncologie, Québec, Québec, Canada, G1V 4G2.

⁷ Centre de recherche en données massives de l'Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6

⁸ Département de biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6

*Corresponding author: Tel. 418-656-8711 ext.3972; email: mathieu.laplante@criucpq.ulaval.ca

Résumé

RAS est une protéine Rho-GTPase à la tête d'un sentier signalétique important dans le contrôle du destin cellulaire. Néanmoins, les mécanismes par lesquels RAS bascule la prolifération vers la sénescence cellulaire ne sont pas bien compris. Ici, nous avons identifié ZNF768 comme une nouvelle phosphoprotéine déstabilisée par la voie RAS. La déplétion de ZNF768 affecte la prolifération et déclenche la sénescence en diminuant l'expression de gènes du cycle cellulaire. ZNF768 disparaît lors de l'entrée en sénescence tandis que sa surexpression aide à contourner la sénescence induite par les oncogènes, par un mécanisme dépendant de p53. ZNF768 interagit avec p53 et réduit sa phosphorylation ainsi que son activité. Nos études montrent que les niveaux de ZNF768 sont élevés dans certaines tumeurs humaines suggérant un rôle de ZNF768 dans la carcinogenèse. Ainsi, nous proposons que ZNF768 est une nouvelle protéine par laquelle RAS contrôle la balance de la prolifération vers la sénescence.

Abstract

RAS proteins are GTPases that lie upstream of a signaling network impacting cell fate determination. How cells integrate RAS activity to balance proliferation and cellular senescence is still incompletely characterized. Here, we identify ZNF768 as a phosphoprotein destabilized upon RAS activation. We report that ZNF768 depletion impairs proliferation and induces senescence by modulating the expression of key cell cycle effectors and established p53 targets. ZNF768 levels decrease in response to replicative-, stress- and oncogene-induced senescence. Interestingly, ZNF768 overexpression contributes to bypass RAS-induced senescence, in a p53-dependent manner. Here, we show that ZNF768 interacts with and represses p53 phosphorylation and activity. Cancer genomics and immunohistochemical analyses revealed that ZNF768 is often amplified and/or overexpressed in tumors, suggesting that cells could use ZNF768 to bypass senescence, sustain proliferation and promote malignant transformation. Thus, we identify ZNF768 as a novel protein linking oncogenic signaling to the control of cell fate decision and proliferation.

Introduction

RAS proteins (HRAS, NRAS and KRAS) are small GTPases that lie upstream of a broad signaling network controlling proliferation. These proteins are often mutated and hyperactive in tumor cells¹. Nearly 30% of human cancers harbor mutations in *RAS* genes. In response to mitogens, RAS activate the Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) and the Mitogen-Activated Protein (MAPK) pathways¹. When active, these two signaling nodes promote cell growth by stimulating various processes including protein, lipid and nucleotide biosynthesis^{2,3}. The rise in *cell mass* linked to the activation of these anabolic processes is a critical feature allowing *cell cycle* entry and normal cell division. PI3K and MAPK activation also drive proliferation by promoting cell cycle progression and by repressing apoptosis through the phosphorylation of numerous effectors⁴⁻⁶. Supporting the role of RAS signaling in promoting cell growth and proliferation, constitutive activation of this pathway was shown to promote the development of various types of cancer in mice⁷.

Although RAS signaling is important to support proliferation, unrestrained RAS activation in primary mammalian cells typically triggers a cascade of molecular and cellular events leading to cellular senescence, a state of permanent cell cycle arrest in which cells remain metabolically active⁸. This process, termed oncogene-induced senescence, has emerged as an important cancer-protective response to oncogenic events, serving to eliminate early neoplastic cells⁹⁻¹². Hyperactive RAS promotes cellular senescence through several complementary routes, which can differ depending on the cellular context. It is generally accepted that oncogenic RAS triggers cellular senescence by activating p53 and p16^{INK4}-Rb pathways, by promoting the degradation of pro-proliferating proteins and by activating the DNA damage response^{8,13-16}. Bypass or evasion from cell senescence has been proposed as a pivotal step in the pre-neoplastic phase leading to cancer^{17,18}.

How exactly cells integrate RAS signaling to balance cellular senescence and proliferation is not well understood. Furthermore, the precise mechanisms by which cells support hyperactive RAS signaling to bypass cellular senescence are incompletely characterized. Here, we report the identification of the transcription factor ZNF768 as a new protein phosphorylated and destabilized upon RAS activation. We show that ZNF768 depletion impairs proliferation and rapidly induces cellular senescence by modulating the expression of key cell cycle effectors and established p53 targets. We found that ZNF768 levels are reduced in response to replicative-, stress- and oncogene-induced senescence and that ZNF768 overexpression contributes to bypass RAS-induced senescence, in a p53-dependent manner. We then show that ZNF768 physically interacts with p53 to repress its phosphorylation and its activity. Cancer genomics and immunohistochemical analyses revealed that ZNF768 is frequently amplified and/or overexpressed in various human malignancies, suggesting that

ZNF768 could contribute to the bypass of cellular senescence and to the promotion of oncogene-induced transformation. Thus, we identify ZNF768 as a novel target of RAS linking growth factor signaling to the control of cell proliferation.

Results

ZNF768 is a phosphoprotein destabilized upon RAS activation.

Analyses of phosphoproteomics studies indicate that ZNF768 is part of a small group of uncharacterized transcriptional regulators potentially phosphorylated downstream of RAS (Fig.S1A)¹⁹. ZNF768 is a 540-amino acid protein conserved in mammals (Fig.S1B). This protein contains C2H2 domains in its C-terminal section and localizes to the nucleus (Fig.S1B and Fig.S1C). A unique feature of ZNF768 is the presence of amino acid stretches at the N-terminal end resembling the heptapeptide repeats found in the C-terminal end of the large subunit (RPB1) of RNA polymerase II (Pol II) (Fig.S1D). Strikingly, large-scale protein sequence analyses using InterPro revealed that, beyond RPB1, ZNF768 is the only human protein containing such repeats (Fig.S1E). In RPB1, these repeats are dynamically phosphorylated by various kinases, which plays fundamental roles in regulating RPB1 function^{20,21}.

To define the relation between RAS activation and ZNF768, we first tested the impact of serum treatment on ZNF768 protein levels (Fig.1A and 1B). Serum stimulation was associated with activation of both MAPK and PI3K signaling and caused a significant decrease in ZNF768 levels (Fig.1B). ZNF768 was also destabilized in cells expressing a constitutively active form of RAS (RAS^{G12V}) (Fig.1C). Supporting the connection between RAS activation and ZNF768, we found that inhibition of downstream effectors of RAS signaling such as MAP/ERK kinase 1 (MEK1) or the mechanistic target of rapamycin (mTOR) with PD098059 (Fig. 1D and S1F) or Torin1 (Fig. 1E and S1G) respectively, led to a rise in ZNF768. Importantly, this effect was not associated with changes in *ZNF768* mRNA expression (Fig.S1H) but was rather linked to increased ZNF768 protein stability (Fig.1F and 1G). We also observed that the effects of MEK and mTOR inhibitors on ZNF768 were additive, indicating that both MAPK and PI3K signaling control ZNF768 stability through parallel and complementary mechanisms (Fig.1H).

The mTOR kinase nucleates two complexes known as mTORC1 and mTORC2 (Fig.1A). To better define which mTOR complex affects ZNF768 stability downstream of RAS/PI3K, RAPTOR or RICTOR were depleted in order to inhibit the action of mTORC1 and mTORC2 respectively. These experiments revealed that inhibition of mTORC2 (Fig.1I), but not mTORC1 (Fig.1J), promotes ZNF768 stability (Fig. 1K). Supporting these findings, inhibition of mTORC1 with rapamycin had no effect on ZNF768 protein levels in all tested cell lines (Fig.S1I). Protein kinase B/Akt (Akt) is directly phosphorylated on serine 473 by mTORC2 and serves as one of its major downstream effectors²². We found that both pharmacological and genetic inactivation of Akt were sufficient to stabilize ZNF768 (Fig.1L-M and S1J). Conversely, constitutive activation of Akt reduced ZNF768

protein levels in various cell types (Fig.1N and S1K). In follow-up experiments, we found that proteasome inhibition with MG132 was sufficient to prevent Akt-mediated degradation of ZNF768 (Fig.1O). Collectively these experiments indicate that hyperactive growth factor signaling destabilizes ZNF768 by promoting its degradation by the proteasome.

We next turned to the online tool PhosphoSitePlus to identify the residues in ZNF768 that were previously reported to be phosphorylated in large-scale phosphoproteomics studies. As shown in Figure 1P, 32 sites were identified in at least one mass spectrometry reference. Strikingly, we found that many of these residues fell within, or near to the heptad repeats stretches in the N-terminal end of ZNF768 (Fig.1Q). To confirm that ZNF768 is phosphorylated on these residues, we performed immunoprecipitations using anti-PXS*P antibody and probed for ZNF768 by western blot. Using this approach, we showed that ZNF768 is phosphorylated on these motifs (Fig.1R), and that oncogenic RAS^{G12V} increases ZNF768 phosphorylation (Fig.1S and 1T). Supporting the importance of phosphorylation for the regulation of ZNF768 stability, we found that serine to alanine mutations on residues S62, S69, S76, S83 and S139 increased ZNF768 stability (Fig.1U). Altogether, these results identify ZNF768 as a new phosphoprotein whose stability is reduced upon RAS activation.

ZNF768 depletion blocks proliferation and induces senescence-like features in cancer cells.

In a first attempt to characterize ZNF768 functions, cancer cell lines of different origins were infected with lentivirus expressing short-hairpin RNA (shRNA) to deplete ZNF768. Although ZNF768 knockdown was initially well tolerated following lentiviral infection, a rise in cell death progressively took place few days post-selection. This effect was associated with an induction of cleaved Caspase 3 and poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP)(Fig.2A), a rise in the expression of proapoptotic genes (Fig.S2A), and a reduction in cell number (Fig.2B). Live-cell imaging revealed that ZNF768 loss reduced the mitotic index and increased mitotic catastrophe, further confirming the proliferation defects associated with ZNF768 depletion (Fig.2C and S2B). While performing the above experiments, we observed that some cells did not die following ZNF768 depletion. A portion of the cells surviving the acute loss of ZNF768 showed clear signs of cellular senescence, including enlarged flatten shape (Fig.S2C to S2E), increased senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -gal) (Fig.2D and S2F), and high expression of genes part of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) (Fig.2E). Interestingly, we also observed that a small fraction of cells surviving ZNF768 depletion could still proliferate and be amplified when cultures were maintained over a longer period of time. As shown in Figure 2F, these cells displayed higher ZNF768 levels compared to the cells collected at early time points following lentiviral infection, indicating that a minimal level of ZNF768 is sufficient to sustain proliferation *in vitro*.

In order to better define the phenotypes linked to ZNF768 depletion, we next generated doxycycline-inducible lentiviral vectors to acutely control the timing and the intensity of ZNF768 knockdown. As shown in Figure S2G, this inducible approach led to a less severe depletion of ZNF768. Partial ZNF768 depletion did not induce apoptosis in any of the cell lines tested (Fig.2G and S2H). However, we found that lowering ZNF768 levels was sufficient to reduce Cyclin B expression, H3 phosphorylation and cell number (Fig.2G, 2H, S2H and S2I). Cells partially depleted from ZNF768 were enlarged, displayed high levels of SA- β -gal activity and showed a significant rise in the expression of established SASP markers (Fig.2I, S2J and S2K). No signs of apoptosis were measured in these cells (Fig.S2L). These results indicate that reducing ZNF768 levels is sufficient to trigger senescence-like features in various cancer cell lines *in vitro*.

ZNF768 depletion affects the expression of key genes controlling proliferation and senescence.

ZNF768 is a transcription factor that binds mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) to control the expression of genes in a cell-specific manner²³. To understand how ZNF768 modulates proliferation and cellular senescence, we first looked at the gene expression profile upon ZNF768 depletion in 6 different cell lines using iLincs, a publicly available resource providing the expression profile of almost 1000 genes (L1000 assay) in response to various perturbagens²⁴. Although ZNF768 depletion affected gene expression differentially in every cell line, 191 genes were found to be similarly regulated in at least 2 of them (Fig.3A). Comprehensive analysis of this gene signature with Metascape revealed a significant enrichment for genes linked to the cell cycle and to the p53 signaling pathway (Fig.3B). To extend the analysis of the gene signature linked to ZNF768 depletion, a genome-wide transcriptomics analysis was performed in U87 cells following ZNF768 knockdown. U87 cells were selected because this cell line was shown to be highly sensitive to ZNF768 depletion (Fig.2B). These experiments were performed rapidly following ZNF768 knockdown in order to characterize the primary effects linked to its cellular depletion (Fig.S3A). Confirming the above findings, we found that the genes affected upon ZNF768 knockdown were also functionally linked to the cell cycle and p53 signaling (Fig.3C, 3D). For instance, genes coding for proteins playing roles in cell cycle regulation (ex. *CDK1*, *MYBL2*, *CCNBI*, *CCNB2*), chromosome segregation (ex. *SMC4*, *NUSAP1*, *AURKA*, *AURKB*, *PLK1*, *CDC20*), genome replication (*PCNA*, *CDC45*, *TOP2A*) and genome stability (ex. *BRCA1*, *DDB2*, *EZH2*, *MYBL2*, *TOP2A*) were severely repressed in ZNF768 depleted cells (Fig.3E). Also, many *bona fide* p53-target genes were significantly upregulated in these cells (ex. *ICAM1*, *FAS*, *GADD45A*, *MDM2*, *PAIL*, *p21*) (Fig.3E). Importantly, the effects of ZNF768 depletion on the expression of most of these genes were reproduced in cells acutely and partially depleted from ZNF768 using our doxycycline-inducible cell lines (Fig.S3B). In these experiments,

the reduction in the expression of genes regulating the cell cycle preceded the transcriptional changes in p53 targets, indicating that ZNF768 depletion sequentially affects gene expression and that the transcription of cell cycle-related genes likely occurs independently of p53. Supporting this hypothesis, we found that ZNF768 depletion repressed the expression of cell cycle-related genes and impaired proliferation to the same extent in p53^{+/+} and p53^{-/-} cells (Fig.S3C to S3E). Interestingly, we measured more SA-β-gal positive cells and higher *p21* expression in p53^{+/+} cells following ZNF768 knockdown (Fig.S3F to S3H), arguing that the induction of cellular senescence in ZNF768 depleted cells strongly depends on p53. Altogether, these results indicate that ZNF768 controls proliferation through p53-dependent and independent processes.

ZNF768 is degraded upon senescence entry.

To define the relationship between ZNF768, cellular senescence and proliferation, we measured ZNF768 protein levels in response to replicative and premature senescence (including oncogene- and stress-induced senescence). To first test the regulation of ZNF768 in response to replicative senescence, protein lysates were prepared from normal human diploid fibroblasts IMR90 cultivated after either low or high population doubling. IMR90 are routinely used to study replicative senescence²⁵. As expected, we observed increased levels of senescence-associated markers in IMR90 cells cultivated for numerous passages (Fig.4A). A significant decrease in ZNF768 protein levels was observed during replicative senescence (Fig.4A). To test whether ZNF768 was similarly repressed in response to premature senescence, we overexpressed oncogenic RAS^{G12V} in IMR90 cells using a tamoxifen-inducible system and followed these cells over 9 days. Cells overexpressing RAS^{G12V} were morphologically elongated and flat, failed to reach confluence and expressed high levels of p21 and p16 (Fig.4B). Interestingly, ZNF768 levels were rapidly reduced upon RAS expression, further supporting a connection between ZNF768 depletion and cellular senescence entry (Fig.4B). We next tested the regulation of ZNF768 during stress-induced senescence triggered by the DNA damaging agent doxorubicin. IMR90 and HCT116 cells were treated overnight with a low dose of doxorubicin (0.1μM) before being washed and followed over 3 days, similarly as described²⁶. In these experiments, we also observed a decrease in ZNF768 levels that was associated with a rise in the expression of senescence markers (Fig.4C and S4A). As previously reported²⁷, Akt was activated in cells treated with doxorubicin and such activation was tightly linked to the degradation of ZNF768 (Fig.S4B). Supporting the results presented above, we found that inhibiting Akt or blocking the proteasome were both sufficient to prevent doxorubicin-mediated ZNF768 degradation (Fig.S4C and S4D).

ZNF768 overexpression contributes to bypass RAS-induced senescence

To determine the role ZNF768 downregulation during oncogene-induced senescence, rescue experiments were performed by overexpressing ZNF768 in primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) during RAS^{G12V}-induced senescence. ZNF768 overexpression alone did not induce any obvious phenotype in MEFs. While the number of SA- β -gal positive cells increased significantly in response to oncogenic RAS^{G12V} expression, ectopic expression of ZNF768 was sufficient to block oncogene-induced senescence in this context (Fig.4D). To further explore the mechanism by which ZNF768 represses oncogene-induced senescence, IMR90 cells were next infected to overexpress RAS^{G12V}, ZNF768, E6 or E7 human papilloma virus oncoproteins, alone or in combination. In these experiments, E6 and E7 were used to repress p53 or Rb respectively, the two major pathways controlling cellular senescence in human fibroblasts²⁸⁻³⁰. As expected, RAS^{G12V} increased the number of SA- β -gal positive cells (Fig.4E, lane 1 vs 3), an effect completely abolished in the presence of E6 and E7 (Fig.4B, lane 3 vs 9). As observed in MEFs, overexpression of ZNF768 contributed to reduce RAS-mediated senescence (Fig.4E, lane 3 vs 4). Inhibition of p53 with E6 did not alter the number of SA- β -gal positive cells measured in cells co-overexpressing RAS^{G12V} and ZNF768 (Fig.4E, lane 5 vs 6). Strikingly, a decrease in RAS^{G12V}-induced senescence was observed upon combined expression of E7 and ZNF768 (Fig.4E, lane 7 vs 8), further indicating that ZNF768 counteracts RAS^{G12V}-induced senescence by negatively regulating the p53 pathway.

ZNF768 interacts with and represses p53 activity

In order to precise the relationship between ZNF768 and p53, U87 cells expressing a doxycycline-inducible shRNA targeting ZNF768 were acutely treated with doxycycline to knockdown ZNF768 and were next exposed to doxorubicin to activate p53 (Fig.S5A and S5B). The expression of established p53 target genes was next assessed as a measure of p53 activity. As depicted in Figure 5A, we observed a pronounced increase in the expression of numerous p53 target genes in cells depleted from ZNF768 and exposed to doxorubicin. In line with these findings, we also measured a rise in the expression of p53 targets when ZNF768 depleted cells were exposed to Nutlin3a, a small molecule that activates p53 (Fig.S5C to S5E)³¹. Strikingly, ZNF768 overexpression repressed the expression of several p53 target genes in cells treated with Nutlin3a (Fig.S5F). The repression in p53 target genes by ZNF768 overexpression was also reproduced in HCT-116 cells, indicating that the control of p53 function by ZNF768 is conserved in various cell lines (Fig.S5G and S5H). Taken together, these results indicate that ZNF768 negatively regulates p53 activity.

As an attempt to understand how ZNF768 represses p53 activity, we looked at p53 total levels, acetylation and phosphorylation in some of the experiments described above, as these

parameters are recognized to play key roles in controlling p53 function³². As shown in Figure 5B and 5C, acute ZNF768 knockdown and overexpression minimally affected p53 total protein and p53 acetylation, but induced profound changes in p53 phosphorylation state. In details, an increase in the phosphorylation of p53 on Ser15 and Ser33 was observed in U87 cells depleted from ZNF768 and acutely treated with doxorubicin (Fig.5B). These findings were reproduced in HCT-116 cells (Fig.S5I). Strikingly, the opposite phenotype was observed in response to ZNF768 overexpression (Fig.5C). Importantly, the modulation in p53 phosphorylation was not linked to variation in the activation of key kinases controlling the phosphorylation of these residues, indicating that ZNF768 unlikely represses p53 phosphorylation and activation through the regulation of these upstream regulators (Fig.S5I). Supporting previous literature showing that p53 phosphorylation impacts p53 stability^{33,34}, we found that ZNF768-mediated repression in p53 phosphorylation was associated with a reduction in total p53 levels several days after exposing cells to doxorubicin (Fig S5G).

In order to gain insights into the molecular mechanism linking ZNF768 to p53, we next performed immunoprecipitation (IP) and mass spectrometry (MS) experiments to define the binding partners of ZNF768. Briefly, V5-tagged ZNF768 or V5-control proteins were overexpressed in 293T cells and independent rounds of IPs followed by MS analyses were performed. These experiments identified 42 proteins that were co-immunoprecipitated with ZNF768 in 2 of 4 IP-MS runs (Fig. 5D). Strikingly, p53 was identified as a potential ZNF768-binding in these assays. In follow-up experiments, we observed that V5-ZNF768 or endogenous ZNF768 were efficiently immunoprecipitating p53 (Fig.5E and S5J). Further confirming this interaction, we also observed that IP of either endogenous p53 or V5-p53 could immunoprecipitate ZNF768 (Fig.5F and S5K). We noticed that deleting the transactivation domain 1 and 2 (TAD1 and TAD2) of p53, a central hub for various co-factors and partners of p53, completely prevented the binding of p53 with ZNF768 (Fig.5G and Fig.S5L). Moreover, deletion of the C-terminal part of p53, that contains the oligomerization domain (OD) and a regulatory domain (RD), two sections required for the tetramerization and the activation of p53, also impaired the interaction with ZNF768 (Fig.5G and Fig.S5L). These results indicate that the N-terminal part of p53 and its oligomerization are required for the interaction with ZNF768. Complementary experiments were next performed to define the domains of ZNF768 contributing to the interaction with p53. In these experiments, we found that deleting the C2H2 domains in ZNF768 completely prevented the interaction with p53 (Fig.5H and S5M). On the other hand, deletion of the CTD domain containing the heptapeptide repeats did not prevent the binding of ZNF768 to endogenous p53 (Fig.5I and S5M), indicating that this section of ZNF768 does not mediate the interaction with p53. Altogether, the results presented above suggest that ZNF768 might repress p53 function by interfering with its phosphorylation through direct interaction. In order to test

this possibility, cells were next infected with lentivirus to overexpress either wild type ZNF768 or mutant isoforms that do not bind to p53 (ZNF768 Δ ZF2) and the phosphorylation state of p53 and its activity were assessed, as described above. We found that preventing ZNF768 binding to p53 was sufficient to restore p53 phosphorylation in cells treated with doxorubicin (Fig.5J). In these cells, the expression of p53 target genes was either partially or completely normalized compared to control cells (Fig.5K). Overall, these results indicate that ZNF768 physically interacts with p53 to repress its phosphorylation and prevent its full activation.

Elevated ZNF768 expression and protein levels in human cancers.

Owing to the importance of ZNF768 in supporting cell proliferation, we next sought to define whether *ZNF768* gene is altered or its expression modulated in human cancers. Analyses of the TCGA PanCancer Atlas Studies through cBioPortal³⁵ revealed that *ZNF768* gene is altered in 1.9% of tumors, with the highest incidence being observed in endometrial carcinomas (5.1%), melanoma (4.7%), invasive breast cancer carcinoma (4.3%), mature B-cell neoplasma (4.2%) and bladder urothelial carcinoma (4.1%) (Fig.6A). A deeper analysis next showed that gene amplification is by far the most frequent alteration found in *ZNF768* gene (Fig.6B). We found that *ZNF768* is amplified in 50.5% of all the tumor samples with altered *ZNF768*. These analyses also revealed that *ZNF768* loss is very uncommon in cancer (Fig.6A and 6B). Hence, the complete deletion of *ZNF768* was observed in only 0.05% of all the tumors included in the TCGA PanCancer Atlas Study. These findings support our previous results showing that severe ZNF768 depletion is not well tolerated by cancer cells *in vitro*. We next performed gene expression analyses using GEPIA, a web tool based on TCGA and GTEx data, to define whether *ZNF768* transcript levels are affected in human cancer³⁶. This analysis revealed that *ZNF768* expression is significantly elevated in 10 out of the 31 cancer types analyzed (Fig.6C and S6A). In detail, high *ZNF768* expression was detected in adrenocortical carcinoma (ACC), breast invasive carcinoma (BRCA), cholangiocarcinoma (CHOL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBC), kidney chromophobe (KICH), kidney renal papillary cell carcinoma (KIRP), lower grade glioma (LGG), liver hepatocellular carcinoma (LIHC) pancreatic adenocarcinoma (PAAD) and thymoma (THYM) (Fig.6C). Only 2 cancer types showed lower *ZNF768* expression in tumors compared to normal tissue, namely acute myeloid leukemia (LAML) and testicular germ cell tumors (TGCT) (Fig.S6A). Altogether, these results indicate that *ZNF768* is often amplified and/or overexpressed in various cancer types in humans.

Because ZNF768 is a protein strongly regulated at the post-translational level, we have initiated studies to measure ZNF768 protein levels in human tumors. Here, we took advantage of samples collected from patients with lung adenocarcinoma (LUAD) or lung squamous cell carcinoma

(LUSC), the most common forms of non-small cell lung carcinomas (NSCLC). These cancer types were chosen for two reasons. First, LUAD and LUSC often carry oncogenic mutations in RAS proteins³⁷. Second, these cancer types do not show severe changes in *ZNF768* mRNA levels (Fig.S6A). As shown in Figure 6D and 6E, we found that many lung tumors showed elevated ZNF768 protein expression relative to the normal, adjacent lung. Immunohistochemistry (IHC) assays revealed a strong nuclear staining in cancer cells of both LUAD and LUSC (Fig.6F). Strikingly, high ZNF768 protein levels were measured in many of the lung tumors carrying oncogenic RAS^{G12V} mutations (Fig.S6B), indicating a disconnection between RAS activation and ZNF768 degradation in advanced tumors. In order to define whether ZNF768 protein levels are also elevated in other cancer types, we looked at publicly available IHC data available through the Human Protein Atlas resource (www.proteinatlas.org)³⁸. Many cancer types, including colorectal, breast and prostate adenocarcinomas, also displayed strong nuclear staining for ZNF768 (Fig.S6C). These results indicate that high ZNF768 may be a common feature of various tumors in humans.

Studies in cancer cells *in vitro* showed that alteration in ZNF768 levels deeply impacts on gene expression (Fig.3). In order to define whether ZNF768 also affects gene expression profile in human cancer, we used TCGA data and performed pathway analyses comparing lung tumors with either low or high *ZNF768* mRNA expression. The GSEA analysis for the LUAD and LUSC tumor samples resulted in 55 and 58 statistically significant pathways respectively (FDR < 1%). Of these, 10 and 9 pathways were upregulated in the high ZNF768 group compared to the low ZNF768 group among the LUAD and LUSC patients respectively. More importantly, we found an enrichment of the cell cycle pathway in tumors with high *ZNF768* expression. This effect was observed in both LUAD and LUSC samples. These results are consistent with our previous data showing the importance of ZNF768 for the expression of several cell cycle genes. Although additional studies are needed to define the precise contribution of ZNF768 to human cancer, these observations suggest that cells might use ZNF768 to sustain proliferation, bypass senescence and promote malignant transformation.

Discussion

Mutations that constitutively activate RAS are among the most common genetic alteration found in human cancers¹. Although RAS signaling is important to support proliferation and promote cancer development, oncogenic activation of RAS in primary mammalian cells triggers cellular senescence⁸. This process is viewed as a safeguard mechanism against neoplasia³⁹. The precise mechanisms by which cells support hyperactive RAS signaling to bypass cellular senescence are still incompletely characterized. Here, we report the identification of ZNF768 as a new protein linking oncogenic RAS to cellular senescence. Our results show that ZNF768 is destabilized upon RAS activation. We show that ZNF768 depletion impairs proliferation and induces senescence by modulating the expression of key cell cycle effectors and established p53 targets. We show that ZNF768 levels decrease in response to replicative-, stress- and oncogene-induced senescence, and that ZNF768 overexpression contributes to bypass RAS-induced senescence, in a p53-dependent manner. We provide evidence that ZNF768 interacts with and represses the activity of p53. Human cancer studies revealed that ZNF768 is often overexpressed in tumors, suggesting that cells might use this protein to bypass senescence, sustain proliferation and promote malignant transformation.

Zinc fingers proteins are one of the most abundant groups of proteins in humans⁴⁰. Among the 1723 annotated ZNFs, ZNF768 is the only one carrying amino acids stretches resembling the heptapeptide repeats found in the C-terminal domain (CTD) of RPB1. Compared to RPB1, which contains 52 repetitions of the consensus $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ motif, ZNF768 carries between 9 and 19 degenerated repeats, a number that varies depending on the homology threshold considered. In RPB1, heptapeptide repeats are phosphorylated by various kinases to regulate transcriptional processes including transcriptional initiation, elongation and termination, as well as mRNA capping, splicing and processing⁴¹. The dynamic phosphorylation of the CTD, often defined as the ‘CTD code’, allows RPB1 to integrate inputs from several effectors to finely regulate transcription and related processes²¹. Here, we show that ZNF768 is phosphorylated on the heptapeptide repeats in response to RAS stimulation, an effect that primes ZNF768 for degradation by the proteasome. Mutations of serine residues (S62A, S69A, S76A, S83A and S139) embedded in these repeats increased ZNF768 levels. We also found that inhibition of both PI3K and MAPK signaling pathways additively increased ZNF768 protein stability. Our findings suggest that the heptapeptide repeats in ZNF768 may serve as a signaling hub allowing the cells to integrate and then couple RAS activity to the control of cell proliferation. Whether specific phosphorylation combinations affect the activity, the binding of partners and/or the localization of ZNF768 remains to be determined. Testing whether a ‘CTD code’ also controls ZNF768 function is an attractive possibility that warrants further investigations.

The complete depletion of ZNF768 represses proliferation. We found that severe ZNF768 loss causes cell cycle defects and promotes both senescence-like features and apoptosis in various cell lines. Additional studies using a doxycycline-inducible approach revealed that the partial loss of ZNF768 also reduces proliferation. However, in that case, this effect was linked to a rise in cellular senescence but no increase in apoptosis. These findings indicate that ZNF768 is essential to sustain proliferation and that partial ZNF768 degradation is sufficient to trigger cellular senescence. Supporting the link between ZNF768 and cellular senescence, we showed that ZNF768 is rapidly depleted in response to replicative-, stress- and oncogene-induced senescence and that its overexpression contributes to bypass this process. The rapid and selective degradation of proteins required for proliferation is a common process that takes place during cellular senescence¹³. Our findings show that ZNF768 is likely part of this senescence-associated protein degradation program and suggest that ZNF768 could represent a novel functional marker of cellular senescence.

A recent study shows that ZNF768 is a transcription factor that binds to MIR sequences²³, a group of retrotransposed DNA elements associated with transcriptionally active euchromatin in mammals^{42,43}. In addition to MIR, ZNF768 also interacts with the promoter of various genes to control their expression²³. Gene expression analyses performed early after the overexpression of a dominant negative ZNF768 revealed that ZNF768 controls the expression of several genes, at least in part in a cell type-specific manner²³. In U2OS cells, many genes regulated by ZNF768 were annotated as DNA binding or zinc finger-containing genes, indicating that ZNF768 is hierarchically located upstream of a broad network of transcription factor genes²³. A closer look at the data presented in this report also shows that repressing ZNF768 reduces the expression of various genes playing roles in cell cycle, cell division and mitosis. Here, we analyzed gene expression upon ZNF768 depletion in numerous cell lines and confirmed the cell-specific impact of ZNF768 on gene expression. Importantly, ontology analyses of the genes affected by ZNF768 in more than one line also revealed a strong enrichment for genes linked to the cell cycle and mitosis. Many genes identified by Rohmoser *et al.* to be repressed upon ZNF768 depletion were confirmed in our study²³. These results indicate that, although ZNF768 controls the expression of genes in a cell-type specific manner, this transcription factor also impacts the expression of a core group of genes that are important to support proliferation. Since ZNF768 is upstream of several other transcription factors, we cannot rule out that part of the effects of ZNF768 depletion on gene expression might be indirect. Regardless of its direct or indirect impact on gene expression, we provide clear evidence that ZNF768 is a key protein relaying growth factor signaling to the control of proliferation.

In addition to impact the expression of pro-proliferative genes, we found that ZNF768 also affects the expression of many *bona fide* p53 targets. In ZNF768 depleted cells, the rise in the expression of p53 targets occurred after the reduction in the expression of cell cycle related genes, suggesting that ZNF768 may act through independent but complementary mechanisms to regulate cell proliferation. On one hand, ZNF768 controls a gene network important for cell cycle progression, mitosis and cell division. On the other hand, ZNF768 physically interacts with p53 and its depletion amplifies p53 phosphorylation and activity. These p53-dependent and -independent modes of action likely explain why ZNF768 depletion impairs proliferation in both p53^{+/+} and p53^{-/-} cells. Although ZNF768 loss decreased proliferation irrespectively of the p53 status, senescence induction and *p21* expression were significantly increased in p53^{+/+} cells, indicating a role for p53 in promoting cellular senescence in ZNF768-depleted cells. Consistently, we observed that ZNF768 overexpression contributed to bypass cellular senescence in primary cells, and that this effect was dependent on p53. Altogether, our findings indicate that ZNF768 is a key player in determining the balance between cellular senescence and proliferation. We propose that the degradation of ZNF768 upon oncogenic RAS activation could thus represent a safeguard mechanism to promote cellular senescence, repress proliferation and protect against malignant transformation.

Cancer genomics analyses show that *ZNF768* gene is altered in 1.9% of human tumors and that approximately half of these alterations are gene amplifications. *ZNF768* mRNA expression is also elevated in several types of cancer. Here, high ZNF768 protein levels were found in nearly 50% of the lung tumor samples tested. Because *ZNF768* is rarely amplified or overexpressed in lung tumors, these results indicate that post-transcriptional and/or post-translational processes likely take place to enforce ZNF768 protein expression in cancer. Thus, elevated ZNF768 levels might be more common in tumors than predicted from cancer genomics and transcriptomics analyses. Supporting this possibility, analysis of ZNF768 protein levels through the Human Protein Atlas resource revealed that many human cancers display intense staining for ZNF768. In line with these observations, previous reports showed that autoantibodies against ZNF768 are detected in the plasma of patients with colorectal cancer^{44,45}, a cancer type in which *ZNF768* mRNA levels are not increased. ZNF768 overexpression might thus be a frequent feature of human cancer. Our findings suggest that sustained ZNF768 expression might offer a proliferative advantage to cancer cells by promoting the expression of key cell cycle regulator and by repressing p53 activity and cellular senescence. Additional studies are needed to define the role of ZNF768 in human cancer.

In conclusion, we provide evidence that ZNF768 is a downstream effector of RAS that serves as a central checkpoint to couple growth factor signaling to the control of proliferation. We propose

a model in which oncogenic RAS promotes ZNF768 degradation, which represses the expression of key proliferative genes, amplifies p53 activity and triggers cellular senescence (Fig.6G). This safeguard mechanism against neoplasia is bypassed by cancer cells, that often overexpress ZNF768 (Fig.6G).

Material and Methods

Cell culture, reagents and vectors. All the cell lines (RPE1, HeLa, U87, HCT116, MDAMB231, HEK 293, Caco-2, HT29, IMR90) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured according to standard mammalian tissue culture protocols and sterile technique. The cell lines were cultured in complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) (10%) (Sigma, #F1051) and penicillin-Streptomycin (1%) (Wisent, #450-201-EL). The following reagents were used in cell culture experiments: Tamoxifen (Sigma, #T5648), PD098059 (Cayman Chemical, #10006726), Torin1 (Cayman Chemical, #10997), Cycloheximide (Sigma, #C7698), Puromycin (Sigma, #P8833), Akt inhibitor VIII (Cayman Chemical #14870), MG132 (Cayman Chemical, #10012628), Doxycycline (Sigma, #D3447), Doxorubicin (Tocris, #2252), Nutlin3a (Cayman Chemical, #18585) and Rapamycin (LC Laboratories, #R5000).

Virus production and infection. Retroviruses were produced using gag/pol and CMV VSV-G as the packaging system. Lentiviruses were produced using psPAX2 and pMD2G. 293T cells were transfected with the vectors. Virus-containing supernatants were collected at 48 hours after transfection and filtered using a 0.45 μ filter. Cells were infected for 24 hours in the presence of 8 μ g/ml polybrene. After infection, the cells were dispersed into fresh medium. Cells were selected on the following days with either 1 μ g/ml puromycin or with 2.5 μ g/ml of blasticidin, depending on the viral constructs.

Vectors. Lentiviral shRNAs were obtained from the collection of The RNAi Consortium (TRC) at the Broad Institute. These shRNAs are named with the numbers found at the TRC public website: shAKT1_1 (TRCN0000010174), shAKT1_2 (TRCN0000010171), shAKT2_1 (TRCN0000255915), shAKT2_2 (TRCN0000255917), shRAPTOR_1 (TRCN0000010415), shRAPTOR_2 (TRCN0000039772), shRICTOR_1 (TRCN0000074290), shRICTOR_2 (TRCN0000074291), shZNF768_1 (TRCN0000017384), shZNF768_2 (TRCN0000017385). For the inducible depletion of ZNF768, the hairpin sequence of shZNF768_1 (TRCN0000017384) was cloned in Tet-pLKO-puro (gift from Dmitri Wiederschain, Addgene plasmid # 21915). Lentiviral constructs for overexpression of V5-tagged proteins were obtained from the collection CCSB Broad Resource. The sequence of these vectors can be found at the TRC public website: pLX304_V5-ACTA1 (ccsbBroad304_13807), pLX304_V5-PDS5A (ccsbBroad304_02741), pLX304_V5-STAG2 (ccsbBroad304_02516), pLX304_V5-TP53 (ccsbBroad304_07088) and pLX304_V5-ZNF768 (ccsbBroad304_12602). The V5-ZNF768 S \rightarrow A phosphomutants were generated using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent, 200519). pLX304_V5-ZNF768 was used as template for the mutagenesis protocol. ZNF768, FLAG-ZNF768, V5-ZNF768 Δ ZF1, V5-ZNF768 Δ ZF2, V5-ZNF768 Δ CTD were

also subcloned in MSCV (Addgene plasmid # 24828, a kind gift from Dr. Lin He) using pLX304_V5-ZNF768 as template. pBabe-Puro-Myr-Flag-Akt1 (Myr-Akt) was a gift from William Hahn (Addgene plasmid #15294). pLNCX2 ER:ras (ER1a-HRAS^{G12V}) was a gift from Masashi Narita (Addgene plasmid #67844). pLXSN-E6/E7, pLXSN-E6, pLXSN-E7, and pLXSN-E7 were gifts from Denise Galloway (Addgene plasmid #52394, #52395 and #52396 respectively). pWZL Hygro-H-Ras was a gift from Scott Lowe (Addgene plasmid #18749). His-p53 and His-p53 Δ -TAD were subcloned in MSCV using pGEX-human p53-(1-393) as a template (gift from Cheryl Arrowsmith, Addgene plasmids #24860). His-p53 Δ -CTD was subcloned in MSCV using pGEX-human p53 (1-320) as a template (gift from Cheryl Arrowsmith, Addgene plasmids #24864).

Protein stability experiments. Cells were treated with cycloheximide (50 μ M) and cells were lysed at the indicated times. ZNF768 stability was measured by comparing the protein levels 1, 2, 4 and 8 hours to the untreated cells.

Immunoprecipitations. Cells were rinsed twice with ice-cold PBS. Cells were next lysed in a buffer containing 40 mM HEPES [pH 7.4], 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium glycerophosphate, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, and one table of EDTA-free protease inhibitors/25ml of buffer. The soluble fractions of cell lysates were isolated by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min in a microcentrifuge. For immunoprecipitations, primary antibodies were added to the lysates and incubated with rotation for 4 hours at 4°C. The following primary antibodies were used (V5-Tag [D3H8Q, Cell Signaling Technology, #13202], p53 [Cell Signaling Technology, #2524], ZNF768 [Aviva Systems Biology, FLJ23436], Phospho-MAPK/CDK substrates (PXS*P or S*PXR/K) [Cell Signaling Technology, #2325]). A 50% slurry of protein G Sepharose was then added, and the incubation continued overnight. Immunoprecipitated proteins were extensively washed before being either denatured and analyzed by western blot, or used for mass spectrometry analyses, as described above.

Western blotting. All cells were rinsed twice with ice-cold PBS before lysis. Cells were lysed with Triton-X 100 containing lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium glycerophosphate, 40 mM NaCl, 50 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton-X 100, and one tablet of EDTA-free protease inhibitors per 25 ml). Tissues were homogenized with the same buffer supplemented with 0.1% sodium lauryl sulfate and 1% sodium deoxycholate. Cells and tissues were rotated at 4°C for 10 minutes and then the soluble fractions of cell lysates were isolated by centrifugation for 10 min in a microcentrifuge. Protein levels were then quantified using Bradford reagent and analyzed by Western blotting. Protein extracts were diluted in sample buffer, denatured by heat (95°C) for 10 minutes and loaded on precast gels (Life

Technologies). Proteins were transferred to PVDF membranes blocked in 5% milk diluted in PBS-Tween and incubated with their primary antibody overnight at 4°C. The following antibodies were used: ZNF768 [Aviva Systems Biology, FLJ23436, dilution 1 :1000] ; Akt (pan) [C67E7, Cell Signaling Technology, #4691, dilution 1:1000] ; Phospho-Akt (ser473) [D9E, Cell Signaling Technology, #9271, dilution 1:1000], Phospho-Akt (Thr308) [244F9, Cell Signaling Technology, #9275, dilution 1:1000], p44/42 MAPK (Erk1/2)[137F5, Cell Signaling Technology, #9102, dilution 1:1000], Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)[D13.14.4E, Cell Signaling Technology, #9101, dilution 1:1000], p70 S6 kinase [Cell Signaling Technology, #9202, dilution 1:1000], Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) [Cell Signaling Technology, #9205, dilution 1:1000], Raptor [24C12, Cell Signaling Technology, #2280, dilution 1:1000], Rictor [53A2, Cell Signaling Technology, #2114, dilution 1:1000], V5-Tag [D3H8Q, Cell Signaling Technology, #13202, dilution 1:1000], Caspase-3 [Cell Signaling Technology, #9662, dilution 1:1000], PARP [46D11, Cell Signaling Technology, #9532, dilution 1:1000], p21 Waf1/Cip1 [12D1, Cell Signaling Technology, #2947, dilution 1:1000], p16 INK4A [D7C1M, Cell Signaling Technology, #80772, dilution 1:1000], p53 [1C12, Cell Signaling Technology, #2524, dilution 1:1000], Cyclin D1 [92G2, Cell Signaling Technology, #2978, dilution 1:1000], Phospho-histone H3 (Ser10) [D2C8, Cell Signaling Technology, #3377, dilution 1:1000], Cyclin B1 [D5C10, Cell Signaling Technology, #12231, dilution 1:1000], anti-β-actin [Cell Signaling Technology, #4967, dilution 1:1000]. Secondary antibodies were purchased for Cell signaling technology.

Mass spectrometry analyses. Proteins on beads were washed 3 times with 50mM ammonium bicarbonate buffer and digested with trypsin (1µg) overnight at 37°C. Reaction was stopped by acidification with 3% acetonitrile-1% TFA-0.5% acetic acid. Beads were removed and the peptides were purified on stage tip (C18) and vacuum dried before MS injection. Samples were solubilised into 10 µl of 0.1% formic acid and by mass spectrometry. Peptide samples were analysed by LC-MS/MS using an Ekspert NanoLC425 (Eksigent) coupled to a 5600+ mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were trapped at 4 µl/min in loading solvent (0.1% formic acid) on a 5mm x 300 µm C18 PepMap cartridge pre-column. Peptides were eluted with a linear gradient from 5-35% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 35 minutes, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Analyst software version 1.7. Each full scan mass spectrum (400 to 1250 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the twenty most intense ions. Dynamic exclusion was set for a period of 12sec and a mass tolerance of 100 ppm. MGF peak list files were created using Protein Pilot version 4.5 software (Sciex). MGF sample files were then analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Mascot was set up to search the Uniport complete proteome HomoSapiens

database (92988 entries) and a contaminant database assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0,1 Da and a parent ion tolerance of 0.1 Da. Scaffold (version Scaffold_4.8.4, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identification. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, Al et al Anal. Chem. 2003;75(17):4646-58). Peptides and Proteins were validated if their FDR were less than 1%. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

Senescence bypass. Senescence bypass experiments were performed in Human foetal lung fibroblasts IMR90 and primary mouse embryonic fibroblasts (MEF) as previously described¹⁴.

SA- β -gal activity assay. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) assays were performed as previously described^{46,47}. Cells were fixed with 0.5% glutaraldehyde in PBS for 15 minutes, then washed and kept in PBS (pH 5.5 for MEF or pH 6.0 for IMR90) containing 1 mM of MgCl₂, for at least 24 hours. Staining was performed at 37°C using a solution containing X-Gal, potassium ferricyanide, potassium ferrocyanide and MgCl₂ in PBS (pH 5.5 or pH 6.0). Images were taken and the percentage of SA- β -gal positive cells was quantified.

Microarray analyses. Whole-genome gene expression was performed using the Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST Array. The RNA was labeled and hybridized using a standard Affymetrix protocol. The quality of arrays was judged using standard quality control parameters and all arrays passed the quality control filters. Expression values were extracted using the Robust Multichip Average (RMA) method⁴⁸ implemented in the *oligo* package in R⁴⁹.

Quantitative real-time PCR. Total mRNA was isolated from cells and tissues using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 74104). Total mRNA was isolated from cells using E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Biotek, R6834-02). RNA concentration was estimated from absorbance at 260 nm. cDNA synthesis was performed using the iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad). mRNA extraction and cDNA synthesis were performed following the manufacturer's instructions. cDNA was diluted in DNase-free water (1:15) before quantification by real-time PCR. mRNA transcript levels were measured in duplicate samples using CFX96 or CFX384 touch™ real-time PCR (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Chemical detection of the PCR products was achieved with SYBR Green (Bio-Rad, 172-5271). At the end of each run, melt curve analyses were performed, and representative samples of each experimental group were run on agarose gel to ensure the specificity of amplification. Gene expression was corrected for the expression level of reference gene. The primer sequences used are presented below.

Primers.

Gene	Sense	Anti-sense
<i>AURKA</i>	AATACAGTCCCACCTTCGGC	GGAGCATGTACTGACCACCC
<i>AURKB</i>	ACACAACGAGACCTATCGCC	ATACAAACACACGCACCCGA
<i>BRCA1</i>	ATGGGCTACAGAAACCGTGC	CATCCCTGGTTCCTTGAGGG
<i>BTG2</i>	GGCTTAAGGTCTTCAGCGGG	CTCCTCGTACAAGACGCAGA
<i>CASP3</i>	AAATACCAGTGGAGGCCGAC	TTCTGTTGCCACCTTTCGGT
<i>CCL2</i>	CTTCATTCCCAAGGGCTCG	GTCTTCGGAGTTTGGGTTTGC
<i>CCNB1</i>	AGGCGAAGATCAACATGGCA	GGGCTTGGAGAGGCAGTATC
<i>CCNB2</i>	GCGTGCCATCCTAGTGGATT	GGCTTTTGATGCTCGCCTTA
<i>CDC20</i>	CCAGTGATCGACACATTCGC	CATGGTCAGACTCAGGACCC
<i>CDC45</i>	AAAGAACC GGCGCTGCAAAC	CCAGAAACTTGCTCCGATCCT
<i>CDK1</i>	GGAAGGGGTTCTAGTACTGC	CCATGTA CTGACCAGGAGGGA
<i>CSF2</i>	AGTAGAGACTGCTGCTGAG	TCATCTGGCCGGTCTCACTC
<i>DDB2</i>	TCTTCTGGCATCAGTTCGCT	AGTCTCTGGAGGCAAGTCCA
<i>EZH2</i>	TGGGAAAGTACACGGGGATAGA	TGGTCCATCTATGTTGGGGG
<i>FAS</i>	GGAGTTGGGGAAGCTCTTCA	GACTGTGCAGTCCCTAGCTT
<i>GADD45A</i>	CCAAGGGGCTGAGTGAGTTC	ACCCAAACTATGGCTGCACA
<i>ICAM1</i>	CTTCGTGTCTGTATGGCCC	TTATGACTGCGGCTGCTACC
<i>IL6</i>	GAAGATTCCAAAGATGTAGCCGC	CTGGCTTGTTCTCACTACTCTCAA
<i>MDM2</i>	TGGTGCTGTAACCACCTCAC	TTTTTGTGCACCAACAGACTT
<i>MYBL2</i>	GCCCAAGAGCACACCTGTTA	GTGTGGGGAGTGTGTCCAT
<i>NQO1</i>	GCTCACCGAGAGCCTAGTTC	CCACCACCTCCCATCCTTTC
<i>NUSPA1</i>	CTTGGGTCTGAAGGGGTCAC	AGCAGAATTCCCCGTGATGG
<i>PAI1</i>	GCAAGGCACCTCTGAGAACT	GGGTGAGAAAACCACGTTGC
<i>PCNA</i>	TTCCTGTGCAAAAGACGGAGT	TCCTCGATCTTGGGAGCCA
<i>PLK1</i>	CAGTGTCAATGCCTCCAAGC	GTGCCGTACGCTCTATGTA
<i>PML</i>	TCGGTGTACCGGGAGATTG	TTGGAACATCCTCGGCAGTAG
<i>p21</i>	AGACTCTCAGGGTCGAAAACG	ATGCCCAGCACTCTTAGGAA
<i>TNFA</i>	TGAAAGCATGATCCGGGACG	GGCCAGAGGGCTGATTAGAG
<i>TOP2A</i>	TTGCAGCCATTGGTCAGTT	ACCACCCAGTACCGATTCTT
<i>ZNF768</i>	CCCCAGGATGTGCAGAGTTC	GCTTTGTGGCTCAAACCCAG

Table 1: List of primers used for qPCR.

Live cell imaging. HeLa cells stably expressing GFP-tagged histone H2B (H2B–GFP cells) were plated onto 35-mm dishes and infected with the respective shRNA. Live-cell imaging was performed with the TE 2000 microscope (Nikon) using a Photometrics CoolSnap HQ camera. Cell culture dishes were placed onto the microscope with an environmental control chamber, maintaining the

temperature at 37°C and the CO₂ at 5%. The cells were imaged every 2 minutes for 16 hours with a Prior motorized stage for four dishes, and a stack of images with a Z-step size of 4.5 µm was collected. All images were collected with Plan Fluor 40×lens (numerical aperture=0.6) with a Chroma filter set 41001 configured for EGFP fluorescent protein tags [i.e. a set of filters for excitation at (emission)=488 nm and 1 (emission)=500–550 nm]. Exposure times were 450 ms with a camera binning of 2. With a scanning stage, Z-stacks (three steps of 1.5 µm) of approximately 6-10 cells were imaged at five different XY positions on three dishes during each experiment. The data were analyzed with MetaMorph software (Molecular Devices). Complementary experiments were performed wild-type HeLa cells to analyse the mitotic defects linked to ZNF768 depletion. Following ZNF768 knockdown, cells were stained with 100nm SiR-DNA and directly used in live-imaging microscopy for 8 hours were imaged by confocal microscopy on an inverted Olympus IX80 microscope equipped with a WaveFX-Borealin-SC Yokagawa spinning disc (Quorum Technologies), a motorized stage (ASI) and an incubator with atmospheric CO₂ heated to 37 °C and an Orca Flash4.0 camera (Hamamatsu). Image acquisition was performed using Metamorph software (Molecular Devices). Mitotic events, metaphase defects (alignments defects or no metaphase phenotype) and anaphase defects (lagging chromosomes and chromosome bridges) were counted.

Human lung samples. The patients included in this study were diagnosed with either lung adenocarcinoma (LUAD) or lung squamous cell carcinoma (LUSC) and underwent surgical resection at the Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (IUCPQ-UL). Lung tumors and adjacent normal lung were collected and stored at the IUCPQ-UL site of the Respiratory Health Network Tissue Bank (www.tissuebank.ca).

Immunohistochemistry. IHC was performed on formalin-fixed paraffin- embedded tissue sections of 4 microns using charged slides. Slides were stained using a fully automated procedure on Dako Autostainer Link 48 (Dako-Agilent Technology, Santa Clara, CA) following heat induced epitope retrieval in a Dako P-T Link with citrate buffer pH:6. IHC was carried out using EnVision FLEX visualization system (Dako). Endogenous peroxidase was inhibited by treating sections with FLEX 0.3% hydrogen peroxide for 5 minutes. Slides were next incubated for 20 minutes with polyclonal rabbit ZNF768 primary antibody (Aviva Systems Biology) at dilution 1:100. Flex HRP polymer was applied for another 20 minutes followed by visualization in DAB, and counterstaining in hematoxylin. Slides were cleared, covered and then scanned on Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT.

Tumor sequencing. DNA was extracted from the tumors using a commercial kit (QIAGEN, #69504). KRAS G12 mutation status was analyzed by ddPCR using a the KRAS Screening Multiplex kit (Biorad, #18603506).

Pathway enrichment analysis. The pathway enrichment analysis was performed by employing the gene set enrichment analysis (GSEA) method using the statistic obtained from the *t test* (that assesses the difference in the gene expression between the two groups). The enrichment score for each pathway was computed using the GSEA method with statistical significance calculated using a permutation test (10,000 permutations). Nominal p-values obtained for each pathway was corrected for multiple testing using the FDR approach, and a threshold of $P < 0.01$ was considered statistically significant.

Aknowledgments

The authors are grateful to Alejo Efeyan and Barbara Martinez-Pastor for advice and assistance. The authors also acknowledge the invaluable collaboration of the surgery team and biobank staff of the IUCPQ-UL. We also want to thank Louis Gaboury and Julie Hinsinger for their technical assistance with the IHC. This work was supported by a foundation grant from the Canadian Institutes of Health Research (to J.-Y.M.). Support to M.L. was provided by the Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI, #705827), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (271671 and 374552), Le Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) (24726), La Fondation de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (IUCPQ-UL), Merck Sharpe and Dohme Corp/Faculté de Médecine de l'Université Laval and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (418158-2012).

Authors contribution

Conceptualization, Villot, R & Laplante, M.; **Methodology**, Villot, R., Poirier, A., Bakan, I & Laplante, M.; **Formal Analysis**, Villot, R., Joubert, P., Manem, V., Bossé, Y., Bilodeau, S & Laplante, M.; **Investigation**, Villot, R., Poirier, A., Bakan, I., Fernández, E., Devillers, R., Boulay, K., Gama-Braga, L., Gagné, A., Bérubé, J.S., Bérubé, J.C., Coulombe, Y., Orain, M., Gélinas, Y & Laplante, M.; **Writing – Original Draft**, Villot, R & Laplante, M.; **Writing – Review & Editing**, Villot, R., Bossé, Y., Masson, J.Y., Elowe, S., Bilodeau, S., Mallette, F.A & Laplante, M.; **Funding Acquisition**, Laplante, M.; **Supervision**, Bilodeau, S & Laplante, M.; **Resources**, Gobeil, S., Bossé, Y., Masson, J.Y., Elowe, S., Joubert, P., Mallette, F.A & Laplante, M.

Figures & Legends

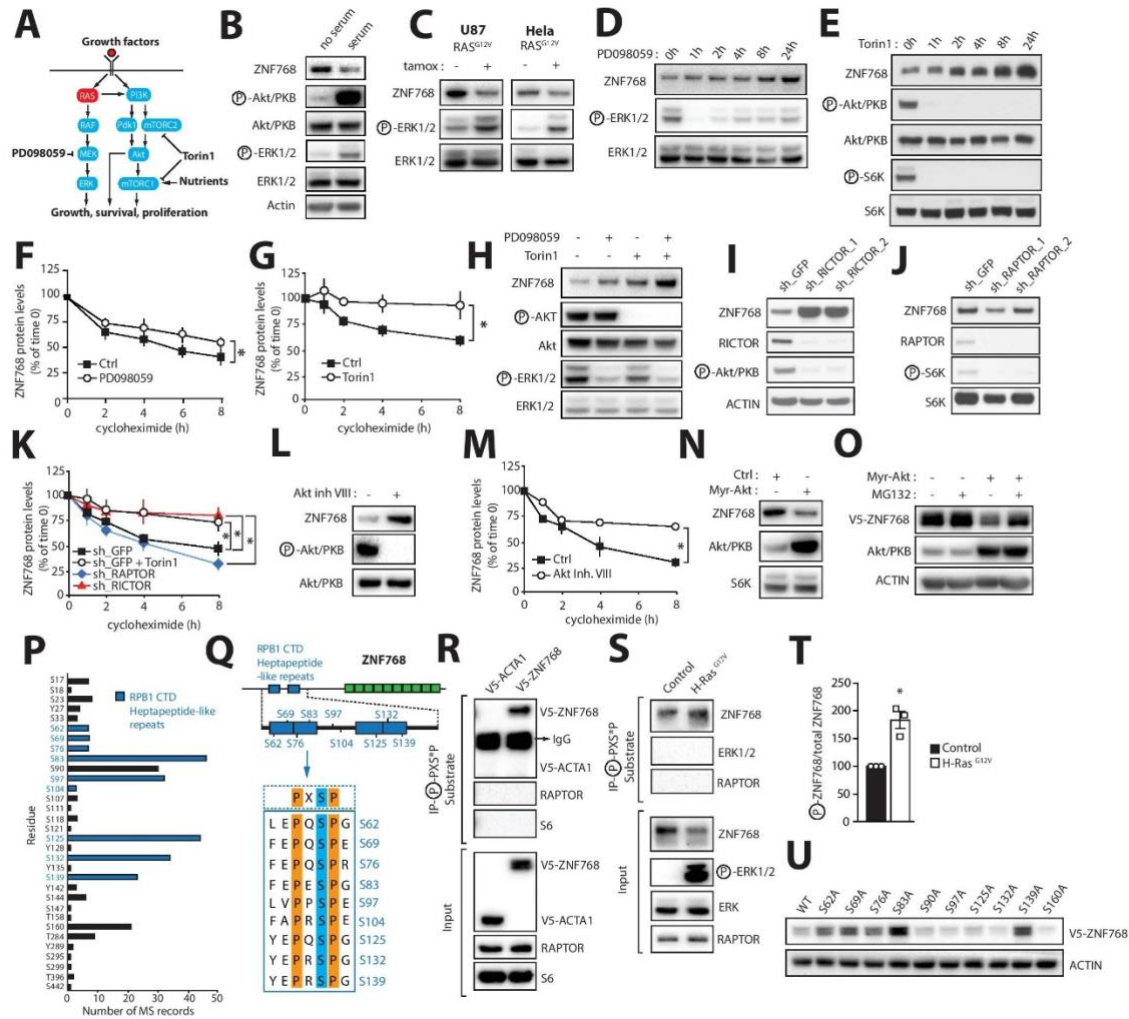


Figure 1: Identification of ZNF768 as a new phosphoprotein destabilized upon RAS activation.

(A) Schematized overview of the RAS signaling pathway. (B) RPE cells were incubated with or without 10% serum for 2 hours. Cells were next lysed and western blot analyses performed for the indicated proteins. This experiment was performed 3 times. (C) U87 and Hela cells were infected to overexpress hyperactive RAS^{G12V} with a hydroxy tamoxifen inducible system. Cells were exposed to 100 μM of 4-OH tamoxifen for 3 days and Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed 3 times. (D-E) U87 cells were treated with (D) PD098059 (50 μM) or (E) Torin1 (250nM) for the indicated time. Western blot analyses were performed on protein lysates. This experiment was performed 3 times. (F-G) U87 cells were pretreated with (F) PD098059 (50 μM, 4 hours) or (G) Torin1 (250nM, 12 hours) and then treated with cycloheximide (1 μg/ml) for the indicated time. Drugs were present for the entire experiment. Cells were lysed at the indicated time and western blot analyses performed to quantify ZNF768 protein levels. The result presented is the summation of 3 independent experiments. (H) U87 cells were treated with PD098059 (50 μM), Torin1 (250nM) or a combination of both drugs for 3 and 1 hours respectively. Western blot analyses were performed for the indicated proteins.

This experiment was performed 3 times. **(I-J)** U87 cells were infected with lentiviruses expressing short-hairpin RNA (shRNA) to knockdown **(I)** RICTOR (shRICTOR) or **(J)** RAPTOR (shRAPTOR). Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed 3 times. **(K)** Control cells (shGFP), shRAPTOR and shRICTOR cell lines were treated with cycloheximide and processed as described in panel F. This experiment was performed 3 times. **(L)** HeLa cells were treated with Akt inhibitor VIII (50 μ M) for 24 hours. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed 3 times. **(M)** U87 cells were treated with Akt inhibitor VIII (50 μ M) for 12 hours and then treated with cycloheximide (1 μ M) as described in F. The results presented is the summation of 2 independent experiments. **(N)** HeLa cells were infected to overexpress a control protein or myristoylated-Akt (myr-Akt). Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed once. **(O)** Cells described in N were infected to express V5-ZNF768 and treated or not with MG132 (20 μ M) for 3 hours. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed 2 times. **(P)** Phosphosite analyses showing the number of MS records for each serine residue found in ZNF768. **(Q)** Structure of ZNF768 protein and phosphorylation motifs found in the CTD domain. **(R)** U87 cells were infected with lentiviruses to overexpress V5-ACTA1 or V5-ZNF768. Immunoprecipitations against the phosphorylated motif PXS*P were performed. This experiment was performed 3 times. **(S-T)** HeLa cells were infected with lentiviruses to overexpress V5-ZNF768 and H-RAS^{G12V} with a hydroxy tamoxifen inducible system. Immunoprecipitations were performed as described in R. This experiment was performed 3 times. The results presented in panel T is the summation of 3 independent experiments. **(U)** U87 cells were infected with lentiviruses to overexpress various ZNF768 phosphomutants (S to A). Cells were lysed and western blot analyses performed. This experiment was performed 3 times. In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel F, G, K and M, significance was determined by Two-way ANOVA ($*p < 0.05$ versus control). In panel T, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test ($*p < 0.05$ versus control).

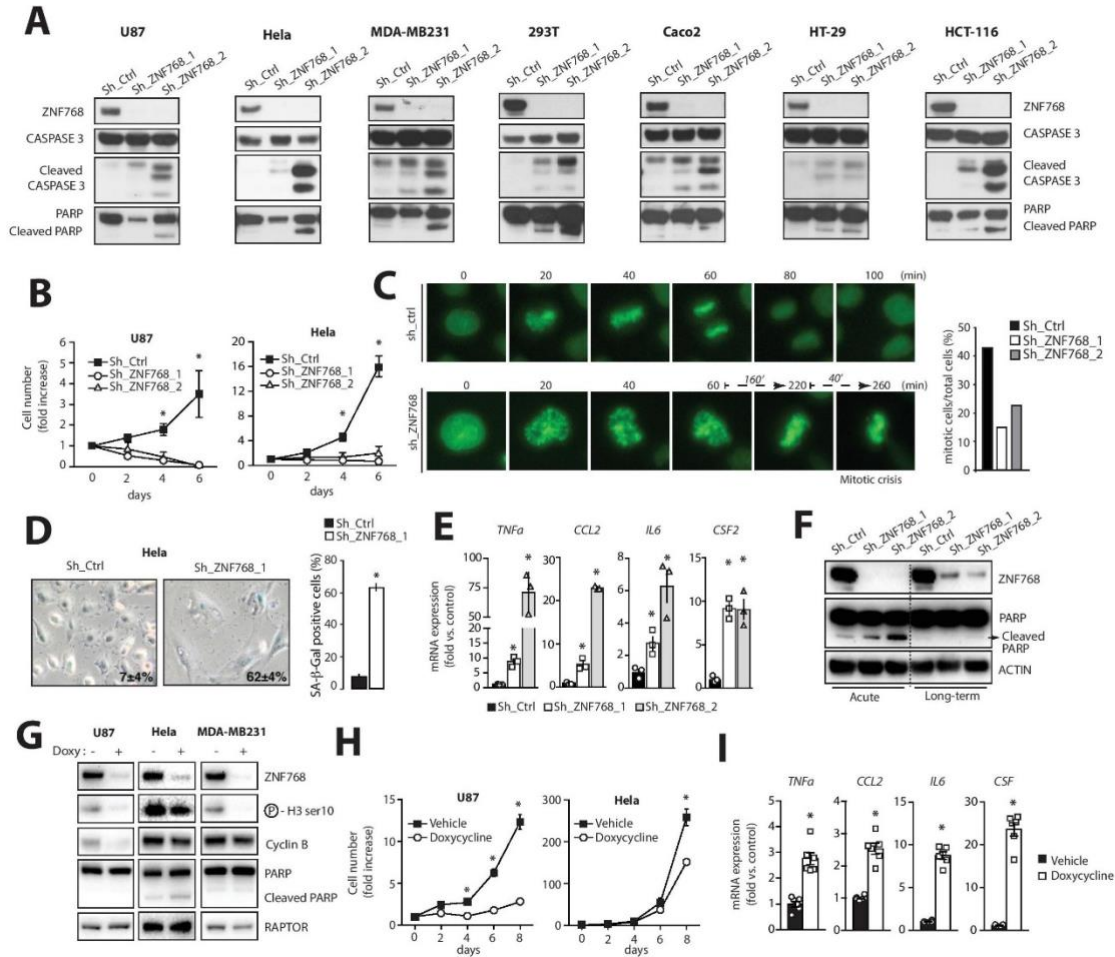


Figure 2: ZNF768 depletion blocks proliferation and induces senescence-like features in cancer cells

(A) Various cell types were infected with lentiviruses expressing shRNA to knockdown ZNF768. Cells were selected with puromycin and protein were extracted. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed at least 2 times for each cell type. (B) U87 and HeLa cells were infected and selected as described in A. Cells were next plated and counted every 2 days. This experiment was performed at 3 times. (C) HeLa cells were infected with lentivirus expressing shRNA to knockdown ZNF768. The cells were stained with SiR-DNA and used in live-imaging microscopy 48 hours after the infection. The mitotic index was calculated from these experiments. (D) HeLa cells were treated as described in A. SA- β -gal staining was performed on these cells following selection. The % of SA- β -gal positive cells is presented in the right part of the panel. (E) U87 cells infected and selected as described in A. RNA was harvested from cells 96h post-infection and the expression of SASP genes was measured by qPCR (n=3/condition). (F) HCT116 cells were infected to knockdown ZNF768, as described in panel A. Protein lysates were harvested 2 days (Acute) or 2 weeks (Long-term) post-infection. This experiment was performed twice. (G) U87, HeLa and MDA-MB231 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of a shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/ μ l) for 48 hours to induce the acute knockdown of ZNF768. Protein lysates were prepared and western blot performed. This experiment was performed 3 times. (H) Inducible U87 and HeLa cells described in G were plated, treated or not with doxycycline (20 ng/ μ l) and counted every 2 days. This experiment was

performed once in each cell line. **(I)** Inducible U87 cells were treated for 7 days with doxycycline (20 ng/ μ l). RNA was harvested and the expression of SASP genes was measured by qPCR (n=6/condition). In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel B and H, significance was determined by Two-way ANOVA with Sidak's multiple-comparisons test (* p < 0.05 versus control). In panel E and I, significance was determined by two-tailed, unpaired t test (* p < 0.05 versus control).

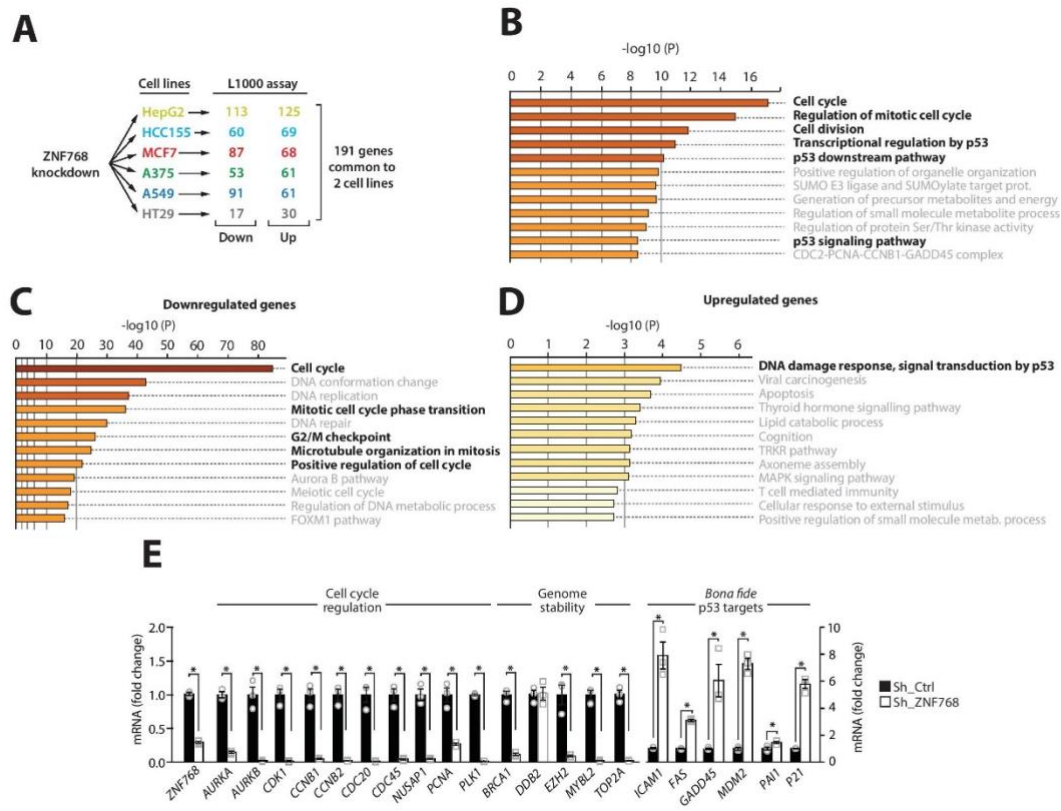


Figure 3: ZNF768 depletion affects the expression of key genes controlling proliferation and senescence.

(A) Schematic overview of the approach designed to test the effect of ZNF768 depletion in various cell lines (HT29, A375, A549, MCF7, HCC155 and HepG2) using the iLincs resource. (B) Gene ontology analysis performed with Metascape of the list of genes regulated in at least 2 cell lines in the analysis described in A. The full list of gene is presented in Table S2 (not shown). (C-D) U87 cells were infected with lentiviruses to knockdown ZNF768. Cells were selected and RNA was isolated 96 hours post infection. A microarray was performed from the isolated RNA. Gene ontology analysis was performed with Metascape on the list of genes identified by microarray that were (C) downregulated or (D) upregulated in response to ZNF768 depletion. The full list of genes is presented in Table S4 and S5 (not shown). (E) qPCR analysis of gene expression in the samples prepared in C-D. In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel C, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test (**p* < 0.05 versus control).

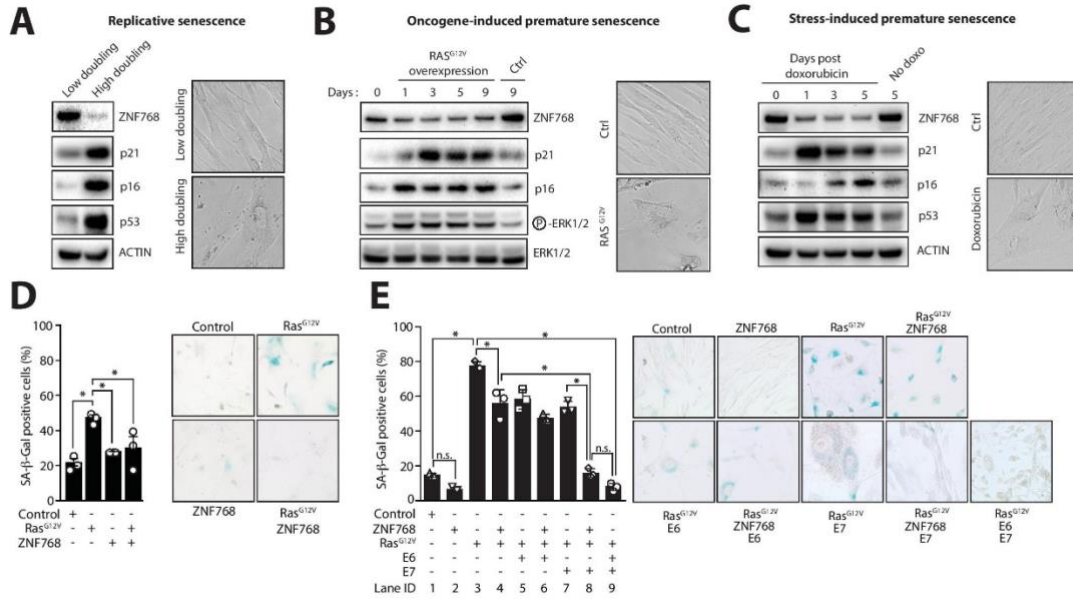


Figure 4: ZNF768 is depleted upon senescence entry and its overexpression contributes to bypass this process.

(A) Protein lysates were prepared from IMR90 cells at Low or High population doublings. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. Representative pictures of the cells are shown on the right part of the panel. This experiment was performed once. (B) IMR90 cells were infected with lentiviruses to overexpress a constitutively active form of RAS^{G12V}. Protein lysates were prepared at the indicated time following the overexpression and western blot analyses were performed for the indicated proteins. Representative pictures of the cells are shown on the right part of the panel. This experiment was performed 3 times. (C) IMR90 cells were treated overnight with doxorubicin (0.1 μM). The cells were next washed and followed for the indicated times. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. Representative pictures of the cells are shown on the right part of the panel. This experiment was performed 3 times. (D) Primary MEF were transduced with retroviruses expressing different combinations of FLAG-ZNF768, RAS^{V12G} or empty vector. After antibiotic selection, cells were maintained in culture until the first signs of senescence bypass were visible. Cells were then fixed and SA-β-gal assays were performed. The percentage of SA-β-gal positive cells is shown. (E) IMR90 cells were transduced with retroviruses expressing different combinations of FLAG-ZNF768, HPV E6, HPV E7, RAS^{V12G} or empty vector. After antibiotic selection, cells were maintained in culture until the first signs of senescence bypass were visible. Images were taken and the percentage of SA-β-gal positive cells was quantified. This experiment was performed 3 times. In all panels, data represent the mean ± SEM. In panels D and E, mean values were compared through a one-way ANOVA, followed by Tukey's Multiple Comparison Test (**p* < 0.05).

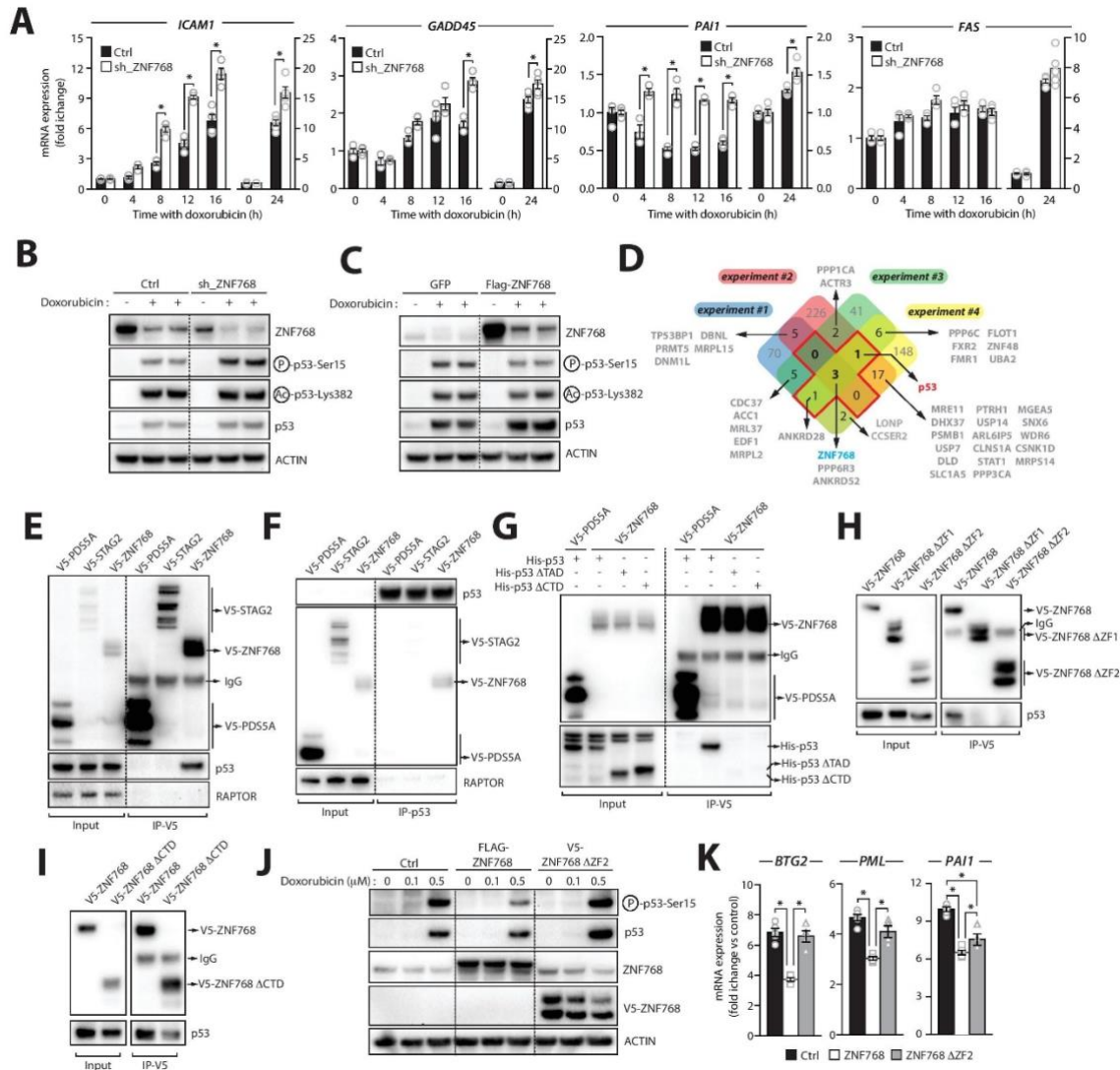


Figure 5: ZNF768 interacts with and represses p53 transcriptional activity.

(A) U87 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/ μ l) for 48 hours to induce the acute knockdown of ZNF768. Cells were next treated with doxorubicin (0.5 μ M) for the indicated time. mRNA was extracted (n=4-5/condition) and gene expression was measured by qPCR. A schematic overview of the experimental design is presented in Figure S5A. Results are presented as fold increase over controls. This experiment was performed twice with the same outcome (B) Proteins were extracted from the cells in the experiment described in A and western blots were performed for the indicated proteins (C) U87 were infected to overexpress Flag-ZNF768. Cells were treated for 24 hours with doxorubicin (0.5 μ M) and proteins were extracted. Western blots were next performed against the indicated proteins. (D) Venn diagram presenting the results of 4 independent rounds of immunoprecipitation (IP). 293T cells were transfected with V5-ACTA or V5-ZNF768 and IPs were performed using an anti-V5 antibody. Immunoprecipitates were analyzed by mass spectrometry. (E) 293T cells were transfected with V5-PDS5A, V5-STAG2 or V5-ZNF768 and V5 proteins were immunoprecipitated. Western blots were next performed for the indicated proteins. (F) 293T cells were transfected with V5-PDS5A, V5-STAG2

or V5-ZNF768 and endogenous p53 was immunoprecipitated. Western blots were next performed for the indicated proteins. **(G)** 293T cells were transfected with V5-PDS5A or V5-ZNF768 in combination with His-p53 (wild-type), His-p53 Δ TAD or His-p53 Δ CTD. Proteins were immunoprecipitated using an anti-V5 antibody. Western blots were next performed for the indicated proteins. **(H-I)** 293T cells were transfected with V5-ZNF768, V5-ZNF768 Δ ZincFinger (ZF)1 (missing amino acids 400 to 540), V5-ZNF768 Δ ZF2 (missing amino acids 252 to 540) or V5-ZNF768 Δ CTD (missing amino acids 1 to 162). A schematic overview of the constructs is presented in Figure S5M. Proteins were immunoprecipitated using an anti-V5 antibody. Western blots were next performed for the indicated proteins. **(J)** HCT-116 cells were infected to overexpress Flag-ZNF768 or V5-ZNF768 Δ ZF2. Cells were treated for 24 hours with doxorubicin (0.5 μ M) and proteins were extracted. Western blots were next performed against the indicated proteins. This experiment was performed 3 times with the same outcome. **(K)** RNA was extracted from the cells treated as described in J and qPCR were performed (n=4/condition). This experiment was performed twice. In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel A, significance was determined by Two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons test (* $p < 0.05$ versus control). In panel K and L, significance was determined by One-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons test.

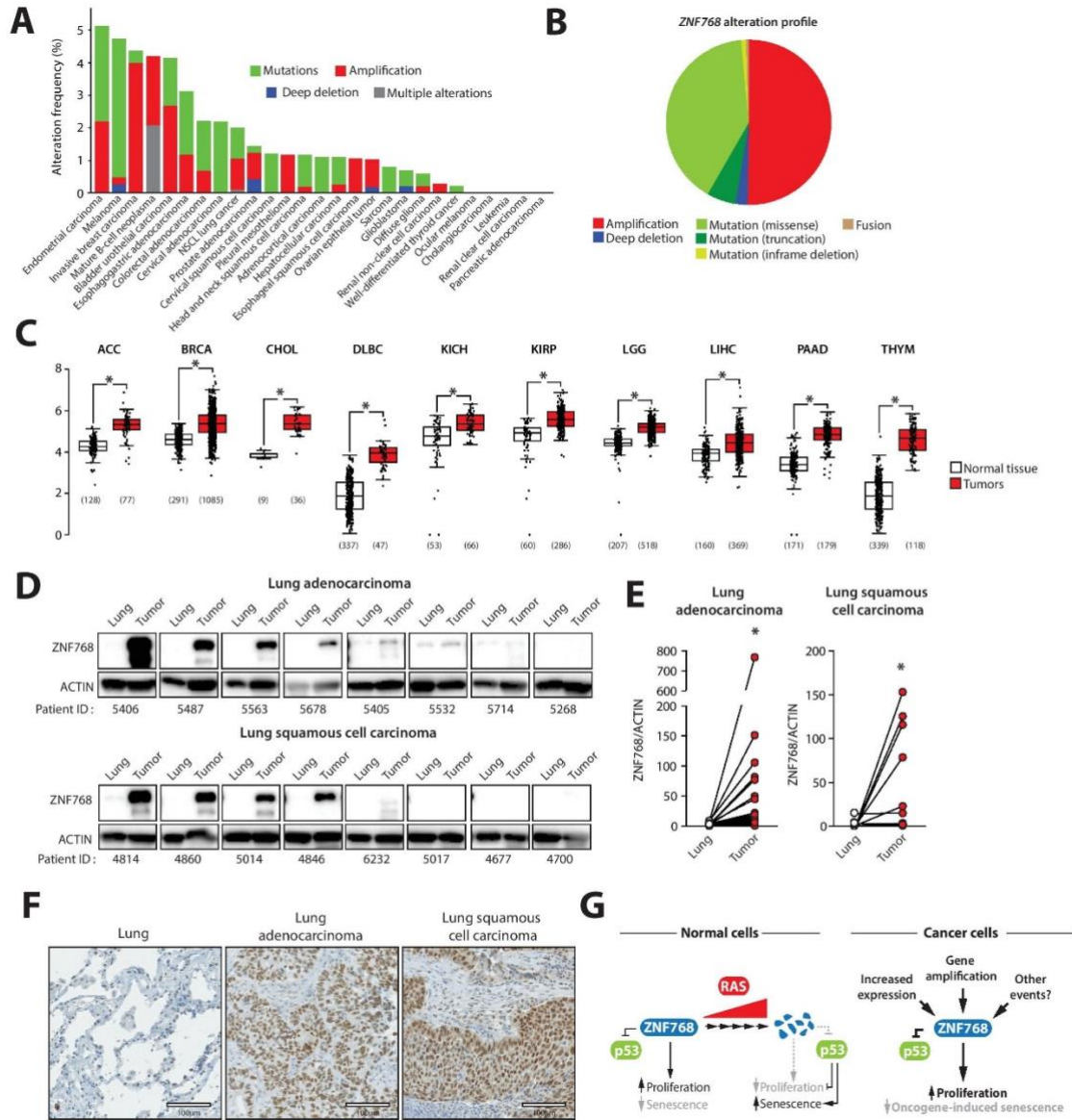


Figure 6: ZNF768 expression and protein levels are elevated in several human cancers.

(A) Large-scale cancer genomics analysis of ZNF768 mutation profile performed using cBioportal and TCGA PanCancer Atlas Studies. (B) Distribution of ZNF768 alteration profile based on the analysis described in A. (C) Gene expression analysis of ZNF768 expression between normal and cancers tissues. This analysis was performed using the GEPIA resource. The Log2 fold change cut-off was set up at 0.5 and the p-value cut-off at 0.001 ($*p < 0.001$ versus control). (D) Western blot analyses of ZNF768 protein levels in lung tumors (adenocarcinoma or squamous cell carcinoma) or normal lung samples collected from human patients. Representative samples are shown. (E) Quantification of ZNF768 protein levels in the experiment described in D. (F) Immunohistochemistry analyses of ZNF768 protein in normal lung and lung tumors. Examples of tumors showing high levels of ZNF768 are presented. (G) Presentation of the proposed functions of ZNF768 in normal and cancer cells. In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel E, significance was determined by paired t test ($*p < 0.05$ versus control).

with unknown relation to growth factor signaling were selected as potential new hits (n=19). All the proteins identified are listed in Table S1 (not shown). **(B)** ZNF768 protein sequences from several organisms were aligned. The blue squares on the N-terminal end represents the CTD domains. The green square in the C-Terminal part marks the C2H2 domains. **(C)** HeLa cells were fractionated to isolate the cytoplasm and nuclei. Proteins were extracted and western blots performed against the indicated proteins. In parallel, GFP-ZNF768 was overexpressed in HeLa cells and live imaging was performed. DAPI was used to stain the nuclei. **(D)** Schematic presentation of ZNF768 protein. The RPB1 CTD heptapeptide-like repeats found in ZNF768 are presented. The consensus heptapeptide repeats and the 31 degenerated repeats present in RPB1 are shown on the right side of the panel. **(E)** Large-scale protein sequence analysis using InterPro indicate that ZNF768 is the only human protein beyond RPB1 that contains heptapeptide repeats. **(F-G)** Various cell lines were treated with either **(F)** PD098059 (50 μ M) or **(G)** Torin1 (250 nM) for the indicated time. Protein lysates were prepared and western blot performed for the indicated proteins. **(H)** U87 cells were treated with either PD098059 (50 μ M) or Torin1 (250 μ M) for 24h hours. mRNA was extracted and ZNF768 expression was measured by qPCR. This experiment was performed once. **(I)** Various cell lines were treated with Rapamycin (100 μ m) for the indicated time. Protein lysates were prepared and western blot performed for the indicated proteins. **(J)** U87 cells were infected with lentiviruses expressing shRNA to knockdown either Akt1 or Akt2. Cells were selected with puromycin and proteins were extracted. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed once. **(K)** HCT116 cells were infected to overexpress a control protein or myristoylated-Akt (myr-Akt). Western blot analyses were performed for the indicated proteins. This experiment was performed once. In all panels, data represent the mean \pm SEM.

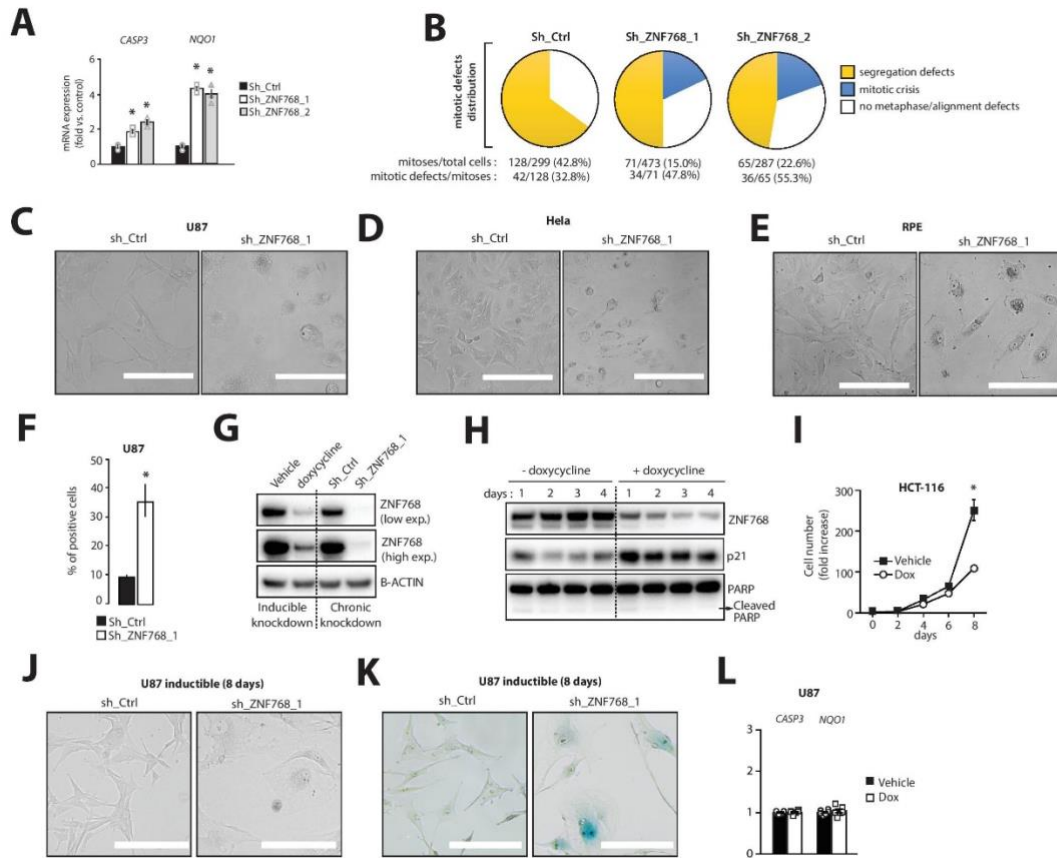


Figure S 2: ZNF768 depletion blocks proliferation and induces senescence-like features in cancer cells

(A) U87 cells were infected with lentiviruses expressing shRNA to knockdown ZNF768 and were selected with puromycin. RNA was harvested from cells 96 hours post-infection and the expression of pro-apoptotic genes was measured by qPCR (n=3/condition). This experiment was performed once. (B) HeLa cells were infected with lentiviruses expressing shRNA to knockdown ZNF768. 48h post infection, cells were stained with SiR-DNA and used in live-imaging microscopy. Mitotic defects were calculated from the movie produced. (C to E) U87, HeLa and RPE cells were infected with lentiviruses expressing shRNA to knockdown ZNF768 and were selected with puromycin. Representative pictures showing the morphology of the cells following ZNF768 knockdown are presented. (F) SA-β-gal staining was performed on U87 cells following ZNF768 knockdown. The % of SA-β-gal positive cells is presented. (G) U87 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of a shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/μl) for 96 hours to induce the acute knockdown of ZNF768 (inducible knockdown). In parallel, other U87 cells were infected for 24 hours with lentivirus expressing a shRNA targeting ZNF768. Cells were selected over the following 72 hours (chronic knockdown). Protein lysates were extracted and western blot were performed for the indicated proteins. (H) HCT-116 cells were treated for the indicated time with doxycycline (20 ng/μl) to knockdown ZNF768. Protein lysates were extracted and western blot were performed for the indicated proteins. This experiment was reproduced at least 3 times with the same outcome. (I) Inducible HCT-116 cells were treated or not with doxycycline (20 ng/μl) to knockdown ZNF768 and counted every 2 days (n=2). This experiment was performed once. (J) Inducible U87 cells were treated for 7 days with doxycycline (20 ng/μl) to knockdown ZNF768 and pictures were taken. Representative images are shown. (K) SA-β-gal staining was performed in the experiment described in J. Representative images are presented. (L) U87 cells were

treated as described in J. RNA was harvested and the expression of genes was measured by qPCR (n=6/condition). This experiment was performed once. In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel A, F and L, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test (**p* < 0.05 versus control). In panel I, significance was determined by Two-way ANOVA with Sidak's multiple-comparisons test (**p* < 0.05 versus control).

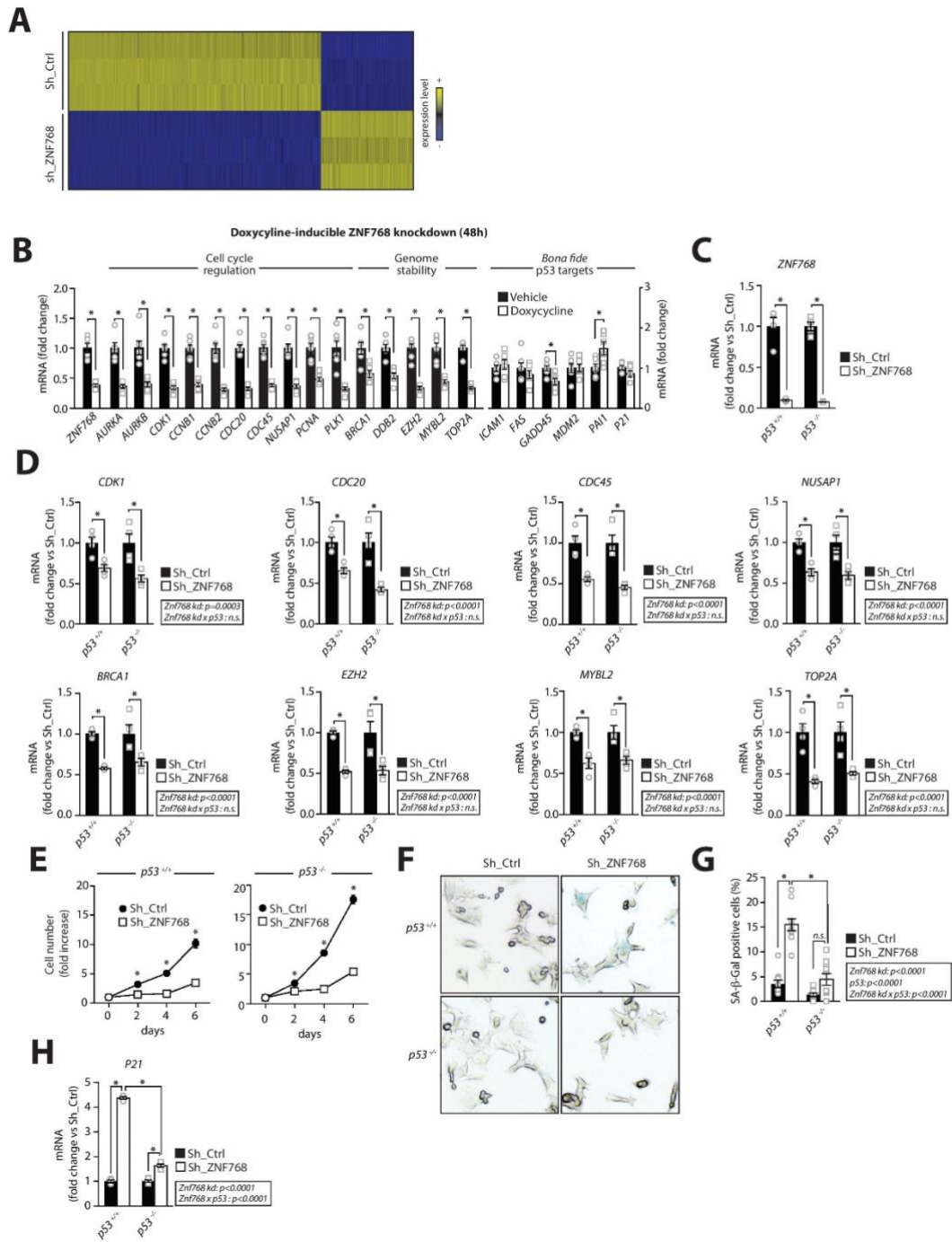


Figure S 3: ZNF768 depletion affects the expression of key genes controlling proliferation and senescence.

(A) Heatmap presenting an overview of the transcriptional impact linked to ZNF768 depletion. U87 cells were infected with lentiviruses to knockdown ZNF768 and selected. 96 hours post infection, RNA was isolated and microarrays were performed. (B) U87 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of a shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/ μ l) for 48 hours to knockdown ZNF768. RNA was harvested and the expression of several genes was measured by qPCR (n=6/condition). (C-D) $p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$ HCT116

cells were infected with lentiviruses to deplete ZNF768. RNA was extracted and qPCR were performed for the indicated genes (n=4/group). For each genotype ($p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$), the impact of ZNF768 depletion is normalized to the control short-hairpin. This experiment was performed once. **(E)** $p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$ HCT116 cells were infected with lentiviruses to deplete ZNF768. 24 hours post-infection, cells were counted (day 0). Other counts were performed at day 2, 4 and 6 (n=2/condition). This experiment was performed twice with the same outcome. **(F-G)** $p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$ HCT116 cells were infected with lentiviruses to deplete ZNF768. SA- β -gal staining were performed 96h post-infection. For each condition, 10 pictures were taken and analyzed. Representative pictures are shown. **(H)** qPCR analyses were performed exactly as described in C (N=4/group). In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel B, significance was determined by two-tailed, unpaired t test ($*p < 0.05$ versus control). In panel C, D, G and H, significance was determined by Two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons ($*p < 0.05$). In panel E, significance was determined by Two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons ($*p < 0.05$).

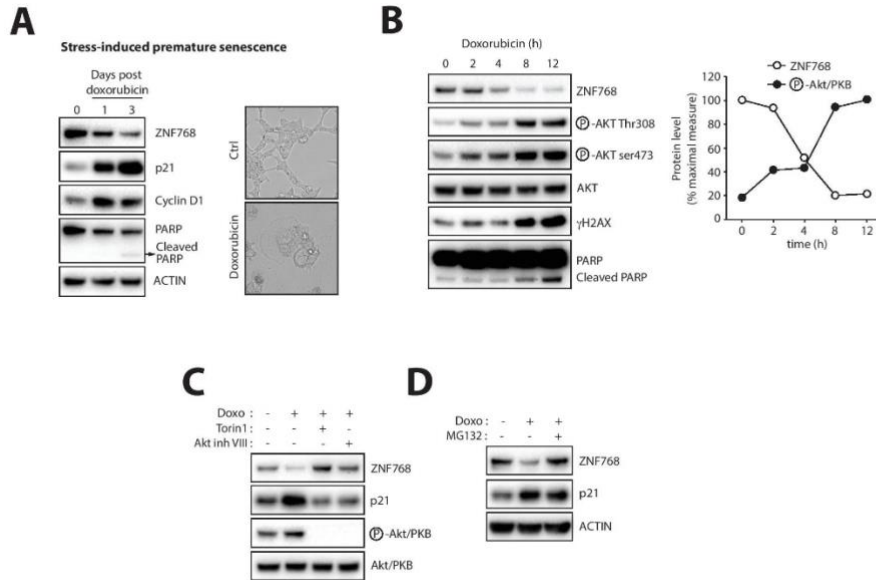


Figure S 4: Doxorubicin-induced ZNF768 degradation is mediated by the PI3K pathway.

(A) IMR90 cells were treated overnight with doxorubicin (0.1 μ M). The cells were next washed and followed for the indicated times. Western blot analyses were performed for the indicated proteins. Representative pictures of the cells are shown on the right part of the panel. This experiment was performed 3 times. (B) HCT116 cells were serum-starved overnight and treated with doxorubicin (1 μ M). Proteins were extracted and western blot analysis were performed for the indicated proteins. Quantification of ZNF768 protein and AKT phosphorylation levels calculated from the experiment is presented on the right part. (C) HCT116 cells were treated with doxorubicin (1 μ M) in the presence of Torin1 (250 nM) or Akt inhibitor VIII (50 μ M) for 6 hours. Protein lysates were extracted for western blot analyses. (D) HCT116 cells expressing V5-ZNF768 were treated with 1 μ M of doxorubicin for 4 hours in the presence of MG132 (20 μ M). In this experiment, cells were pre-treated with MG132 2 hours prior to doxorubicin exposition. Proteins were extracted and western blots were performed for the indicated proteins.

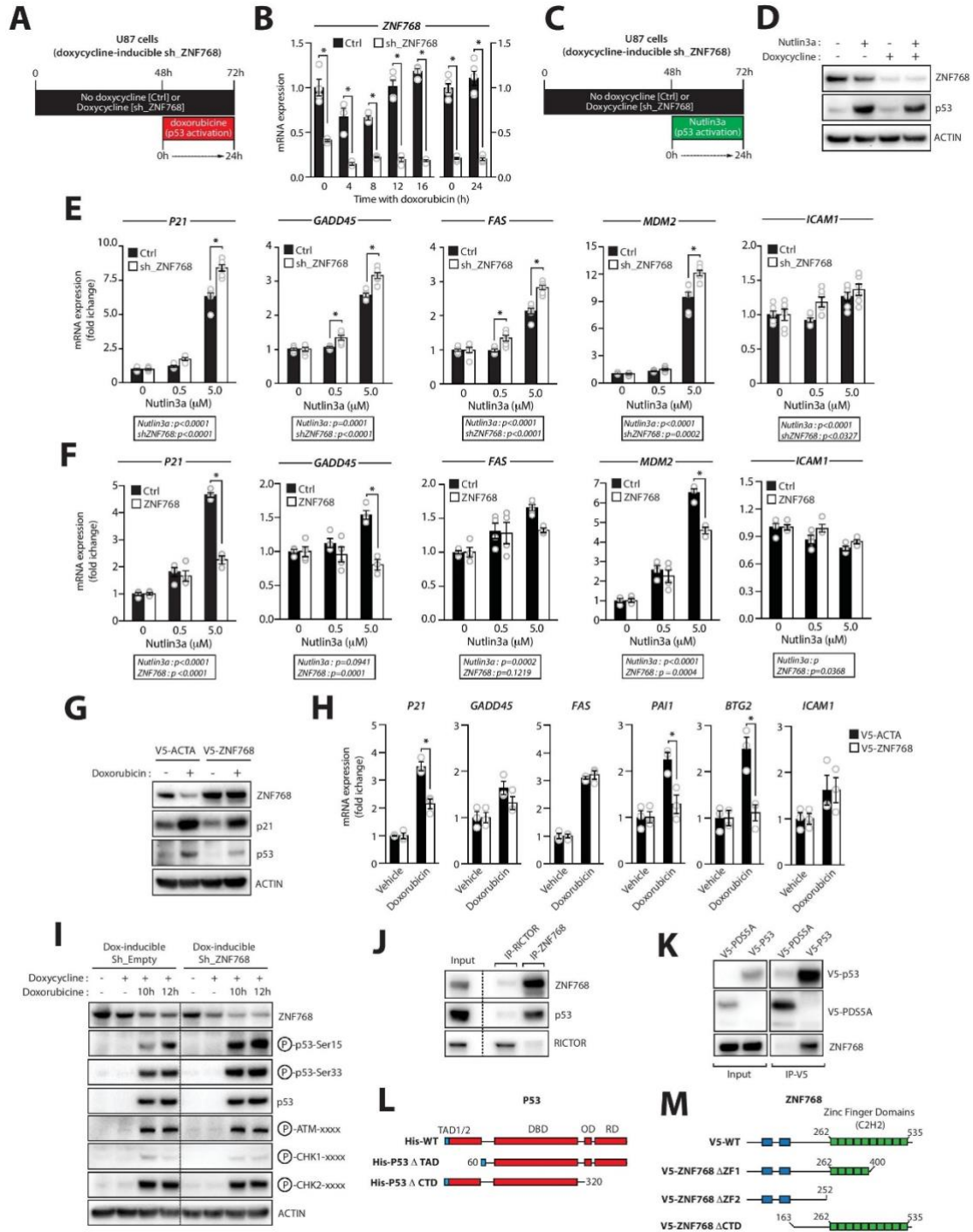


Figure S 5: ZNF768 interacts with and represses p53 transcriptional activity.

(A) Schematic representation of the experimental design related to Figure 5A. Briefly, U87 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of a shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/ μ l) for 48 hours to induce the acute knockdown of ZNF768. Cells were next treated with doxorubicin (0.5 μ M) for the indicated time. This experiment was performed twice with the same outcome. (B) mRNA was

extracted (n=4-5/condition) from the cells described in A and gene expression was measured by qPCR. **(C)** Schematic representation of the experimental design related to Figure S5D and S5E. Briefly, U87 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of a shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/ μ l) for 48 hours to induce the acute knockdown of ZNF768. Cells were next treated with escalating doses of Nutlin3a for 24 hours. **(D)** Proteins were extracted from the cells in the experiment described in C and western blots were performed for the indicated proteins. **(E)** mRNA was extracted from the cells treated as described in C and gene expression was measured by qPCR (n=6/condition). This experiment was performed twice. **(F)** U87 cells were infected with lentiviruses to overexpress ZNF768. Cells were next treated with escalating doses of Nutlin3a for 24 hours. mRNA was extracted and gene expression was measured by qPCR (n=6/condition). This experiment was performed twice. **(G)** Validation of HCT116 O/E and doxorubicin treatment as describe in (H). **(H)** HCT116 were infected to overexpress ZNF768. Following selection, cells were treated with 0.1 μ M of doxorubicin for 4 hours. The cells were next washed and mRNA was extracted 48 hours later. Quantitative PCR analyses were next performed (n=3 conditions). **(I)** HCT116 cells were infected with a lentivirus allowing the conditional expression of a shRNA targeting ZNF768. After selection with puromycin, cells were treated with doxycycline (20 ng/ μ l) overnight to induce the acute knockdown of ZNF768. Cells were next treated with doxorubicin 0.5 μ M for the indicated time. **(J)** Endogenous ZNF768 or RICTOR were immunoprecipitated from 293T cells and western blots were performed for the indicated proteins. This experiment was reproduced 3 times with a similar outcome. **(K)** 293T cells were transfected with V5-PDS5A or V5-p53 and V5-tagged proteins were immunoprecipitated. Western blots were next performed for the indicated proteins. This experiment was reproduced 3 times with a similar outcome. **(L)** Schematic overview of the p53 constructs used in the IP experiments described in Figure 5G. **(M)** Schematic overview of the ZNF768 constructs used in the IP experiments described in Figure 5H and I. In all panels, data represent the mean \pm SEM. In panel B, E, F and H significance was determined by Two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons test (* p < 0.05 versus control).

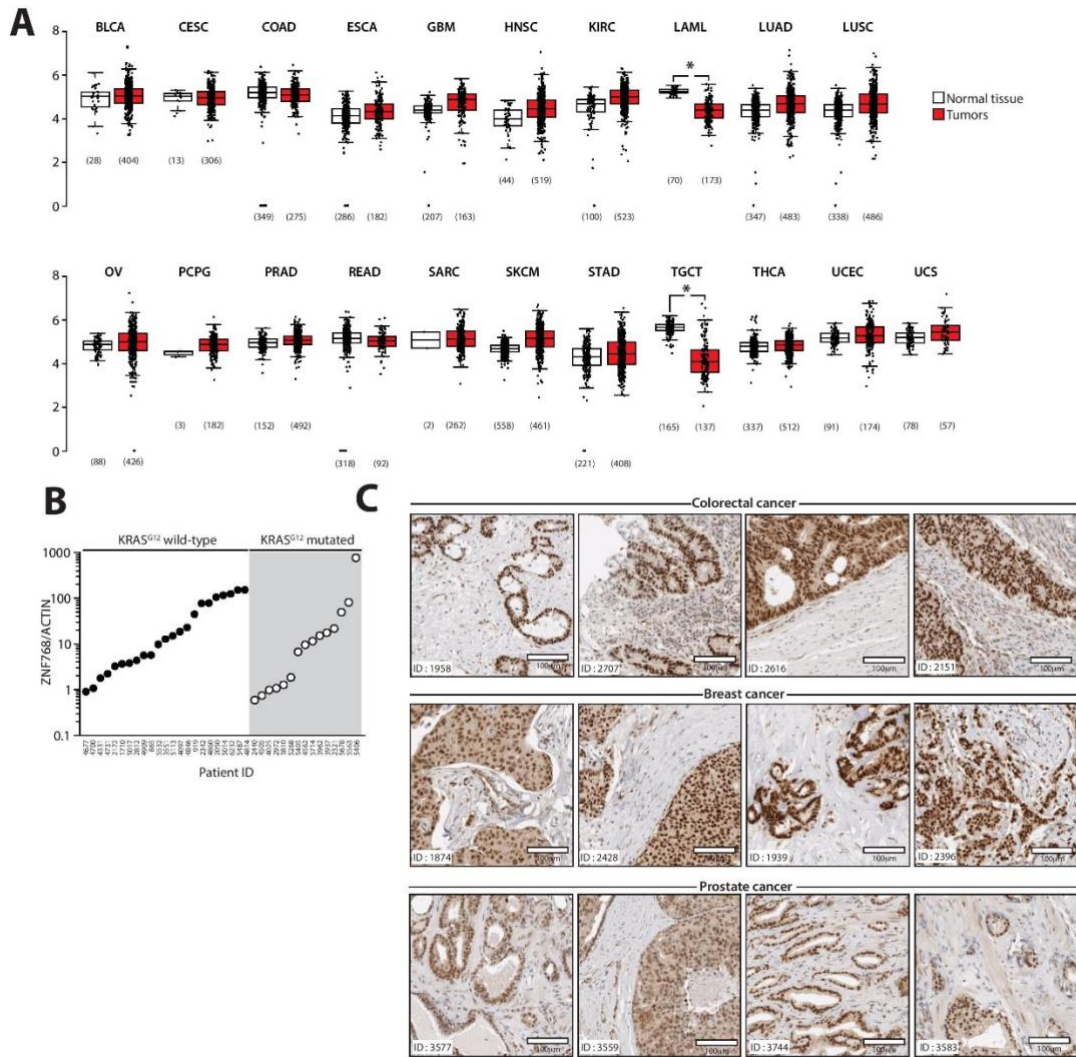


Figure S 6: ZNF768 expression and protein levels are elevated in several human cancers.

(A) Gene expression analysis of ZNF768 expression between normal and cancer tissues. This analysis was performed using the GEPIA resource. The Log2 fold change cut-off was set up at 0.5 and the p -value cut-off at 0.001 ($*p < 0.001$ versus control). (B) Lung tumors samples were genotyped for the presence of altered KRAS^{G12} allele and sorted according to ZNF768 protein levels. ZNF768 protein levels were measured by western blot, as described in Figure 6D. (C) Immunohistochemistry analyses of ZNF768 protein in colorectal, breast and prostate cancer tumors. Examples of tumors showing high levels of ZNF768 are presented. The picture presented was extracted from the Human Protein Atlas resource (www.proteinatlas.org). Representative pictures are shown.

Bibliographie

- 1 Simanshu, D. K., Nissley, D. V. & McCormick, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 170, 17-33, doi:10.1016/j.cell.2017.06.009 (2017).
- 2 Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293, doi:S0092-8674(12)00351-0 [pii]10.1016/j.cell.2012.03.017 (2012).
- 3 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960-976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 (2017).
- 4 Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83, doi:10.1128/MMBR.00031-10 (2011).
- 5 Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274 (2007).
- 6 Fruman, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* 170, 605-635, doi:10.1016/j.cell.2017.07.029 (2017).
- 7 O'Hagan, R. C. & Heyer, J. KRAS Mouse Models: Modeling Cancer Harboring KRAS Mutations. *Genes Cancer* 2, 335-343, doi:10.1177/1947601911408080 (2011).
- 8 Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602, doi:10.1016/s0092-8674(00)81902-9 (1997).
- 9 Braig, M. et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665, doi:10.1038/nature03841 (2005).
- 10 Chen, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730, doi:10.1038/nature03918 (2005).
- 11 Collado, M. et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642, doi:10.1038/436642a (2005).
- 12 Michaloglou, C. et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724, doi:10.1038/nature03890 (2005).
- 13 Deschenes-Simard, X. et al. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* 27, 900-915, doi:10.1101/gad.203984.112 (2013).
- 14 Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21, 43-48, doi:10.1101/gad.1487307 (2007).
- 15 Di Micco, R. et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642, doi:10.1038/nature05327 (2006).
- 16 Bartkova, J. et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637, doi:10.1038/nature05268 (2006).
- 17 Lee, S. & Schmitt, C. A. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol* 21, 94-101, doi:10.1038/s41556-018-0249-2 (2019).
- 18 Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 23, 620-633, doi:10.1016/j.tcb.2013.07.006 (2013).

- 19 Hsu, P. P. et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332, 1317-1322, doi:332/6035/1317 [pii] 10.1126/science.1199498 (2011).
- 20 Buratowski, S. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36, 541-546, doi:10.1016/j.molcel.2009.10.019 (2009).
- 21 Harlen, K. M. & Churchman, L. S. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 263-273, doi:10.1038/nrm.2017.10 (2017).
- 22 Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101 (2005).
- 23 Rohrmoser, M. et al. MIR sequences recruit zinc finger protein ZNF768 to expressed genes. *Nucleic acids research* 47, 700-715, doi:10.1093/nar/gky1148 (2019).
- 24 Subramanian, A. et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell* 171, 1437-1452 e1417, doi:10.1016/j.cell.2017.10.049 (2017).
- 25 Hernandez-Segura, A. et al. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* 27, 2652-2660 e2654, doi:10.1016/j.cub.2017.07.033 (2017).
- 26 Sliwinska, M. A. et al. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev* 130, 24-32, doi:10.1016/j.mad.2008.04.011 (2009).
- 27 Brown, K. K., Montaser-Kouhsari, L., Beck, A. H. & Toker, A. MERIT40 Is an Akt Substrate that Promotes Resolution of DNA Damage Induced by Chemotherapy. *Cell reports* 11, 1358-1366, doi:10.1016/j.celrep.2015.05.004 (2015).
- 28 Jones, D. L. & Munger, K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Semin Cancer Biol* 7, 327-337, doi:10.1006/scbi.1996.0042 (1996).
- 29 Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136, doi:10.1016/0092-8674(90)90409-8 (1990).
- 30 Mallette, F. A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M. F., Moiseeva, O. & Ferbeyre, G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91-99, doi:10.1038/sj.onc.1206886 (2004).
- 31 Vassilev, L. T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848, doi:10.1126/science.1092472 (2004).
- 32 Meek, D. W. & Anderson, C. W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000950, doi:10.1101/cshperspect.a000950 (2009).
- 33 Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. & Vousden, K. H. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19, 1751-1758, doi:10.1128/mcb.19.3.1751 (1999).
- 34 Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334, doi:10.1016/s0092-8674(00)80416-x (1997).
- 35 Cerami, E. et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401-404, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095 (2012).

- 36 Tang, Z. et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic acids research* 45, W98-W102, doi:10.1093/nar/gkx247 (2017).
- 37 Mascaux, C. et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 92, 131-139, doi:10.1038/sj.bjc.6602258 (2005).
- 38 Uhlen, M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419, doi:10.1126/science.1260419 (2015).
- 39 Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51-57, doi:10.1038/nrc2772 (2010).
- 40 Cassandri, M. et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 3, 17071, doi:10.1038/cddiscovery.2017.71 (2017).
- 41 Hsin, J. P. & Manley, J. L. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* 26, 2119-2137, doi:10.1101/gad.200303.112 (2012).
- 42 Jjingo, D. et al. Mammalian-wide interspersed repeat (MIR)-derived enhancers and the regulation of human gene expression. *Mob DNA* 5, 14, doi:10.1186/1759-8753-5-14 (2014).
- 43 Jjingo, D., Huda, A., Gundapuneni, M., Marino-Ramirez, L. & Jordan, I. K. Effect of the transposable element environment of human genes on gene length and expression. *Genome Biol Evol* 3, 259-271, doi:10.1093/gbe/evr015 (2011).
- 44 Kijanka, G. et al. Human IgG antibody profiles differentiate between symptomatic patients with and without colorectal cancer. *Gut* 59, 69-78, doi:10.1136/gut.2009.178574 (2010).
- 45 O'Reilly, J. A. et al. Diagnostic potential of zinc finger protein-specific autoantibodies and associated linear B-cell epitopes in colorectal cancer. *PLoS ONE* 10, e0123469, doi:10.1371/journal.pone.0123469 (2015).
- 46 Mallette, F. A. & Richard, S. JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5. *Cell reports* 2, 1233-1243, doi:10.1016/j.celrep.2012.09.033 (2012).
- 47 Neault, M., Mallette, F. A. & Richard, S. miR-137 Modulates a Tumor Suppressor Network-Inducing Senescence in Pancreatic Cancer Cells. *Cell reports* 14, 1966-1978, doi:10.1016/j.celrep.2016.01.068 (2016).
- 48 Irizarry, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high-density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264 (2003).
- 49 Carvalho, B. S. & Irizarry, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 26, 2363-2367, doi:10.1093/bioinformatics/btq431 (2010).

CHAPITRE 2

Discussion générale.

1. ZNF768, une protéine à doigts de zinc « pas comme les autres ».

1.1 Résumé des principaux résultats.

Mes travaux de thèse présentés ici portent sur ZNF768, une protéine à doigts de zinc que nous avons identifiée à partir du phosphoprotéome de mTOR, et que nous avons associée à la voie de signalisation RAS/PI3K. La voie RAS/PI3K est au cœur de la signalisation des facteurs de croissance, et culmine vers la prolifération, la croissance ainsi que la survie cellulaire. Cela passe principalement par l'activation des MAPs kinases via RAS et de la voie mTOR/AKT par la PI3K. De nombreux cancers présentent des mutations activatrices dans un ou plusieurs(s) composant(s) de cet axe signalétique, qui sont associées à des cancers agressifs laissant peu de chances à une rémission. Au-delà des MAPs kinases et de la voie mTOR/AKT, la signalisation sous-jacente à cet axe est très complexe et fait intervenir de nombreuses protéines nucléaires et facteurs de transcription. L'impact de la voie RAS/PI3K sur la croissance et la prolifération est parfois contradictoire puisque les cellules normales qui perçoivent une suractivité de ce sentier rencontrent généralement un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Appelé sénescence induite par les oncogènes, ce phénomène permet d'éviter la transformation tumorale, bien que les mécanismes à son origine ne soient que partiellement compris. Ces mêmes mécanismes sont renversés lors du développement du cancer pour permettre à la cellule de poursuivre la prolifération malgré un profil oncogénique aberrant. Le but de ce projet portait donc sur l'identification de nouvelles cibles de la voie RAS/PI3K, afin de mieux comprendre son rôle dans la croissance, la prolifération et la carcinogénèse. Au début de ce projet, ZNF768 était quasiment inconnue de la littérature. Nous avons tout d'abord caractérisé la place de ZNF768 dans la signalisation des facteurs de croissance, et nous sommes arrivés à la conclusion que les voies RAS/MAPK et PI3K/mTORC2/AKT (axe RAS/PI3K) convergent vers une régulation négative de ZNF768 au niveau post-traductionnel. Par la suite, des expériences de déplétion de ZNF768 par interférence à l'ARN dans différentes lignées cellulaires cancéreuses ou simplement transformées ont révélé une haute importance de ZNF768 dans la prolifération et la survie cellulaire. L'arrêt de la prolifération induit par la perte de ZNF768 s'accompagne d'une chute massive de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, suivi par une entrée en sénescence. À l'aide d'outils bio-informatiques, nous avons constaté que plusieurs cibles géniques du suppresseur de tumeurs p53 étaient induites par la perte de ZNF768, ce qui a dès lors suggéré un rôle de p53 dans

l'arrêt du cycle associé. Néanmoins, nous avons mis en évidence que p53 n'est pas indispensable à l'arrêt de la prolifération associé à la disparition de ZNF768, mais favorise fortement l'entrée en sénescence. De manière intéressante, ZNF768 est déplétée dans tout contexte de sénescence, qu'elle soit induite par le stress réplicatif, oncogénique ou génotoxique. À ce titre, l'induction de dommages à l'ADN déclenche la dégradation rapide de ZNF768 par des mécanismes qui mobilisent AKT et le protéasome. Des expériences de surexpression de ZNF768 en condition de sénescence induite par RAS ont aussi indiqué que ZNF768 favorise l'évasion de la sénescence d'une manière majoritairement dépendante de p53. ZNF768 interagit physiquement avec ce dernier (p53) et inhibe son activité transcriptionnelle, en affectant (au moins en partie) son état de phosphorylation. En vue du rôle majeur de la sénescence et de p53 dans la carcinogénèse, nous avons quantifié les niveaux de ZNF768 dans plusieurs échantillons de tumeurs du poumon et avons observé une augmentation massive de ZNF768 dans les tumeurs, au niveau protéique et transcriptionnel. Mis ensemble, ces résultats nous ont amené à proposer un modèle dans lequel ZNF768 est nécessaire pour maintenir la prolifération cellulaire, via son rôle de facteur de transcription et par son effet inhibiteur sur p53. En cas de perturbation oncogénique/génotoxique, ZNF768 est dégradée par des mécanismes qui dépendent au moins en partie de l'axe RAS/PI3K. Lors de la transformation tumorale, nous pensons qu'une pression de sélection opère et favorise l'expression protéique de ZNF768 qui contribue à l'évasion de la sénescence et peut-être au développement général du cancer (voir Figure 1).

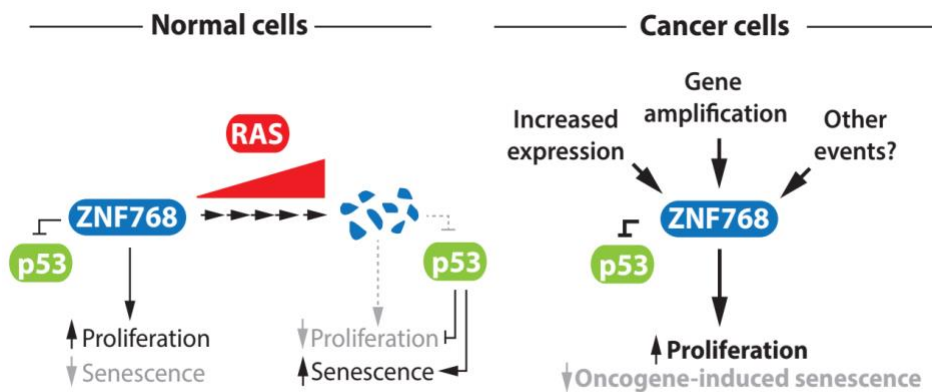


Figure 1: Mode d'action proposé de ZNF768.

1.2 Identification de ZNF768 comme une cible potentielle de la voie RAS/PI3K.

Afin d'identifier des nouveaux facteurs de transcription potentiellement régulés par l'axe RAS/PI3K, nous avons utilisé une étude phosphoprotéomique publiée dans le journal *Science* en 2011 (Hsu et al., 2011). Cette étude a fourni une liste conséquente de protéines dont la phosphorylation est modulée par le blocage pharmacologique de mTOR (Hsu et al., 2011). À partir de cette liste, nous avons identifié les régulateurs transcriptionnels potentiels (facteurs ou cofacteurs de transcription et modificateurs d'histones) et nous avons sélectionné ceux n'ayant aucune relation connue avec la signalisation des facteurs de croissance. Dans cette liste de 19 protéines, notre choix s'est arrêté sur ZNF768 car celle-ci fait partie des protéines les moins caractérisées et possède en plus un domaine CTD très apparenté au domaine CTD de RPB1 (sous-unité de l'ARN polymérase II). À l'aide du site en ligne PhosphoSitePlus, on constate que ZNF768 est une phosphoprotéine qui présente plusieurs sites consensus de phosphorylation par les MAPs kinases et les CDKs (motif Proline-résidu X-Sérine-Proline, P-X-S-P) (voir Figure 2). ZNF768 possède aussi deux sites apparentés aux motifs consensus de phosphorylation par AKT (Arginine-résidu X-résidu X-Sérine/Thréonine, R-X-X-S/T, le motif consensus initiale étant Arginine-résidu X-résidu X-Arginine-résidu X-résidu X-Sérine/Thréonine, R-X-X-R-X-X-S/T) (voir Figure 2). Avec ces informations, nous avons conclu que ZNF768 est une cible potentielle de la voie RAS/PI3K.

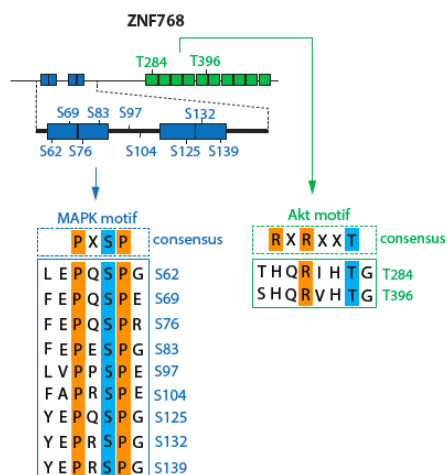


Figure 2: Motif consensus de phosphorylation retrouvés sur ZNF768.

Source: PhosphoSitePlus (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=6308&showAllSites=true>).

1.3. ZNF768 est une protéine à doigts de zinc.

Les protéines à doigts de zinc forment une famille de protéines avec de multiples résidus cystéines (Cys) et/ou histidines (His), dont la stabilité et les divers repliements nécessitent la présence de zinc (Cassandri et al., 2017). Bien qu'il existe au moins 30 types de protéines à doigts de zinc, les plus fréquents sont les types classiques Cys2His2 (Cystéine 2 Histidine 2, C2H2), et non-classiques RING (Really Interesting New Gene), PHD (Plant Homeodomain), et LIM (Lin-11, Isl-1, and Mec-3) (Cassandri et al., 2017) (voir Figure 3).

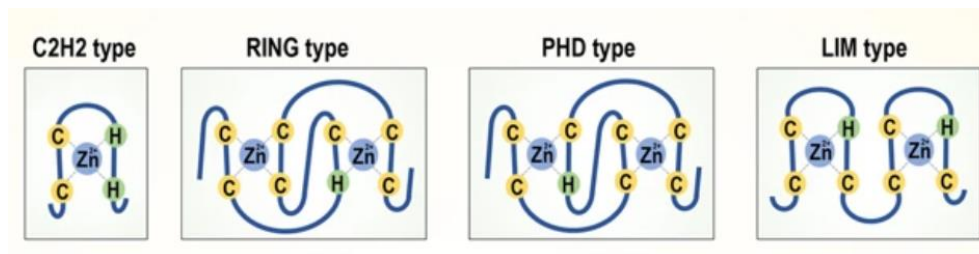


Figure 3: Les types de domaines les plus abondants chez les protéines à doigts de zinc.

Source, (Cassandri et al., 2017).

Les protéines à doigts de zinc peuvent interagir de façon spécifique avec l'ADN mais aussi avec l'ARN, les protéines, et même des molécules organiques comme le poly-ADP-ribose (PAR) (Cassandri et al., 2017). Cette famille de protéines est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose, mais aussi dans des événements plus spécifiques comme la transcription et la réparation des dommages à l'ADN (Cassandri et al., 2017). Il existe un nombre incalculable de structures tertiaires possiblement adoptées par les protéines à doigts de zinc selon la disponibilité en zinc et la chaîne polypeptidique.

ZNF768 présente 10 domaines de type Cys2His2. Dans cette sous-famille, deux cystéines et deux histidines utilisent un ion Zn^{2+} pour assurer divers repliements (Cassandri et al., 2017). On estime que 0,7% des gènes de *Caenorhabditis elegans* contiennent des séquences codantes pour des domaines Cys2His2 avec une fraction similaire estimée chez l'humain (Wolfe et al., 2000). Ce type de domaine est commun dans le règne des eucaryotes et représente la plus large famille de facteurs de transcription comprenant des centaines de membres dans le génome humain (Rizkallah et al., 2011). Ainsi, ZNF768 entre dans un cadre classique de facteur de transcription dont la spécificité des cibles ADN peut être conférée par les multiples repliements de ses domaines à doigts de zinc (Rohrmoser et al., 2019).

1.4. Le domaine CTD de ZNF768.

1.4.1. Généralités sur le domaine CTD de RPB1.

Les domaines à doigts de zinc sont fréquents dans le monde du vivant et sont même retrouvés chez certains procaryotes (Malgieri et al., 2015). Cependant, une partie de ZNF768 est particulièrement rare. Dans son extrémité N-terminale, on retrouve une séquence apparentée à l'extrémité C-terminale de RPB1, la plus large sous-unité de l'ARN polymérase II (Pol II). Ce domaine est quasiment exclusif à RPB1, même si on retrouve des séquences apparentées dans quelques autres protéines, dont ZNF768 (Chapman et al., 2008). Baptisé simplement CTD, ce domaine est d'une haute importance pour le contrôle de l'activité de Pol II (Jeronimo et al., 2016). Les domaines apparentés au CTD de RPB1 sont composés d'une répétition en tandem d'heptapeptides, qui contiennent généralement deux prolines séparées par au moins un résidu phosphorylable comme la sérine (Chapman et al., 2008). Chez un certain nombre d'organismes classés dans ce qu'on appelle le clade CTD, on retrouve le motif consensus conservé Y(Tyr) S(Ser) P(Pro) T(Thr) S(Ser) P(Pro) S(Ser) (chaque résidu étant référé à un nombre relatif à sa place dans l'heptapeptide: Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇) (Chapman et al., 2008). Le clade CTD englobe les mammifères mais aussi des organismes unicellulaires comme la levure (Chapman et al., 2008). Bien que le nombre de répétitions de ce motif soit très variable entre les espèces, les vertébrés ont conservé 52 répétitions dont 21 correspondent parfaitement à la séquence consensus (Hsin et Manley, 2012). Les 31 autres répétitions (non-consensus) ont accumulé une ou plusieurs substitution(s) (Chapman et al., 2008; Hsin et Manley, 2012). Le CTD de RPB1 est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles, ce qui suggère l'existence d'un « code CTD » à l'instar du « code histone » (Harlen et Churchman, 2017). Les modifications post-traductionnelles en jeu comptent principalement des phosphorylations, mais aussi des méthylations, acétylations et ubiquitinations (Harlen et Churchman, 2017). Les kinases responsables des phosphorylations du CTD sont avant tout des CDKs telles que CDK7, CDK8 et CDK9 (Zaborowska et al., 2016).

Le CTD est important pour le bon fonctionnement des étapes de la transcription (initiation, élongation et terminaison), et on le considère comme une piste d'atterrissage pour une panoplie de facteurs de transcription, modificateurs de la chromatine ou de maturation de l'ARN (Harlen et Churchman, 2017). Il a été montré chez la drosophile que le CTD couplé à une protéine fluorescente mais dépourvue du reste de la protéine RPB1 et du complexe Pol II rentre tout de même dans des foyers de transcription active, ce qui indique que le CTD est une séquence signal pour la transcription (Lu et al., 2019).

Le complexe de pré-initiation de la transcription comprend un ensemble de protéines qui assure l'assemblage et la stabilité de l'ARN polymérase II au niveau du site de démarrage de la transcription

(TSS, Transcription Start Site). De manière intéressante, Pol II s'assemble au niveau du complexe de pré-initiation de la transcription avec RPB1 dans un état non phosphorylé (Zaborowska et al., 2016). Par la suite, la phosphorylation des sérines 5 (YSPTS₅PS) du CTD augmente massivement (proche du TSS) pour diminuer graduellement au cours de l'élongation, au profit des sérines 2 (YS₂PTSPS) dont la phosphorylation atteint son maximum vers la fin du gène (Zaborowska et al., 2016). La phosphorylation de la sérine 5 est donc associée à l'initiation de la transcription tandis que la phosphorylation de la sérine 2 est plutôt spécifique de l'élongation (Zaborowska et al., 2016). De fait, le modèle actuel supporte que les différentes combinaisons de phosphorylations et de déphosphorylations du CTD régulent l'arrimage et le blocage des facteurs transcriptionnels intervenant de l'initiation jusqu'à la terminaison de la transcription.

1.4.2. ZNF768 présente un domaine CTD partiellement conservé.

Uniquement chez les mammifères placentaires, ZNF768 a acquis entre 10 et 20 répétitions d'heptapeptides très similaires à ceux du CTD de RPB1 (variable selon les espèces), les résidus consensus les mieux conservés étant la sérine 5 et la proline 6 (Rohrmoser et al., 2019). Nous avons pu observer à l'aide du site en ligne PhosphoSitePlus que la plupart des résidus phosphorylés de ZNF768 sont situés dans son domaine CTD (résidus 1 à 163) (voir Figure 4).

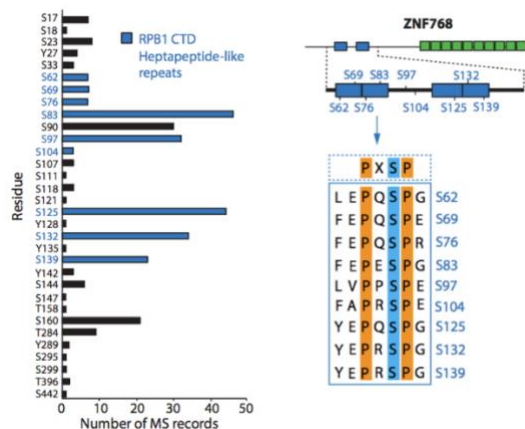


Figure 4: Phosphorylation de ZNF768.

Source: PhosphoSitePlus (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=6308&showAllSites=true>).

Les phosphorylations des sérines 83 et 139 qui correspondent à des sérines 5 et que nous avons clairement associées à la stabilité de ZNF768 ont été identifiées dans de nombreuses études de spectrométrie de masse (voir Figure 4). Tout comme pour le CTD de Pol II, il existe possiblement un code CTD de ZNF768 tout aussi complexe, allant au-delà du contrôle de sa stabilité. De manière

surprenante, les résidus correspondant aux sérines 2 de RPB1 sont fréquemment remplacées par un acide glutamique (E), qui peut être apparenté à un acide aminé phosphorylé en continu (ou phosphomimétique) (Rohrmoser et al., 2019). La sélection de tels résidus sur ce qui correspond aux sérines 2 de RPB1 est particulièrement intrigante. Tel que mentionné précédemment, la phosphorylation de la sérine 2 de RPB1 survient lors de l'élongation de la transcription, et sa fonction actuelle supposée est de bloquer l'intervention de facteurs négatifs de l'élongation (Zaborowska et al., 2016). On peut alors supposer, en tenant pour acquis que le CTD de ZNF768 fonctionne comme celui de RPB1, que le remplacement de la sérine 2 par un acide aminé phosphomimétique favorise l'élongation de la transcription des cibles transcriptionnelles de ZNF768. D'ailleurs, Rohrmoser et ses collaborateurs ont démontré que les gènes reconnus par ZNF768 sont significativement plus exprimés que la moyenne des autres gènes (Rohrmoser et al., 2019).

2. ZNF768, un facteur de transcription au cœur de la signalisation des facteurs de croissance et du contrôle de la prolifération cellulaire.

2.1 ZNF768 est négativement régulé au niveau post-traductionnel par la voie RAS/PI3K.

En sur-exprimant différents composants de la voie RAS/PI3K et en utilisant l'ARN interférence, ainsi que plusieurs inhibiteurs pharmacologiques, nous avons constaté que les voies RAS/MAPK et PI3K/mTORC2/AKT convergent vers une régulation négative de ZNF768 au niveau post-traductionnel. Par ailleurs, la surexpression de RAS augmente les niveaux de phosphorylation de ZNF768, comme l'ont indiqué des expériences d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre les motifs consensus de phosphorylation par les MAPKs et les CDKs. Bien que ces mécanismes puissent être indirects et impliquer d'autres effecteurs sous-jacents, l'ensemble de ces résultats démontre que l'axe RAS/PI3K (via les voies MAPKs et mTORC2/AKT) déstabilise ZNF768 au niveau post-traductionnel. De manière intéressante, les sérines 83 et 139 (S83, S139) sont critiques pour la stabilité de ZNF768.

Actuellement, les mécanismes qui lient la phosphorylation de ZNF768 à sa dégradation ne sont pas compris. Il est connu que certaines phosphorylations peuvent promouvoir l'ubiquitination et la dégradation rapide des protéines (Holt, 2012). D'après le site en ligne PhosphoSitePlus, l'ubiquitination de ZNF768 a lieu sur la lysine 306 (K306) et la lysine 464 (K464). Il sera intéressant d'évaluer si ces ubiquitinations ont bien lieu et si celles-ci sont associées à la phosphorylation ainsi qu'à la dégradation de ZNF768. Les anticorps dirigés contre l'ubiquitine sont très souvent utilisés et pourraient être utiles pour étudier l'ubiquitination de ZNF768 dans divers contextes.

2.2 ZNF768 est un facteur de transcription de haute importance pour la prolifération cellulaire.

2.2.1 La perte de ZNF768 affecte la prolifération et déclenche la sénescence cellulaire.

À la vue du peu de documentation disponible sur ZNF768, les premières questions que nous nous sommes posées portaient sur le phénotype cellulaire induit par une perte de ZNF768. Par interférence à l'ARN, nous avons réprimé ZNF768 de façon aigue et partielle dans différentes lignées cellulaires cancéreuses ou simplement transformées. Dans toutes les lignées testées, la déplétion aigue de ZNF768 par infection lentivirale affecte drastiquement la prolifération et entraîne l'apoptose ou une entrée en sénescence. Néanmoins, une déplétion partielle de ZNF768 déclenche la sénescence cellulaire sans apoptose apparente, ce qui suggère une réponse cellulaire différente selon le degré de réduction de ZNF768. Il est probable qu'il existe un seuil critique des niveaux de ZNF768 qui bascule la sénescence vers l'apoptose (voir partie 2.3.2).

2.2.2 ZNF768 est un facteur de transcription important pour l'expression de gènes spécifiques du cycle cellulaire.

Nos expériences de transcriptomiques sur puce à ADN ont mis en évidence qu'une perte aigue de ZNF768 réprime fortement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la mitose. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes codants pour des kinases mitotiques importantes comme *AURKA* (*Aurora kinase A*), *AURKB* (*Aurora kinase B*) et *PLK1* (*Polo like kinase 1*). Ces gènes sont aussi affectés par une courte et partielle déplétion de ZNF768 ce qui peut expliquer son rôle important dans la prolifération. Diverses cibles transcriptionnelles du suppresseur de tumeurs p53 sont induites par la perte profonde de ZNF768 ce qui suggère une contribution de ce facteur de transcription dans le phénotype observé. En utilisant une lignée cellulaire HCT116 sauvage et une autre dépourvue de p53, nous avons constaté que l'impact transcriptionnel et l'arrêt de la prolifération déclenché par la perte de ZNF768 ne sont pas dépendants de p53. Néanmoins, l'entrée en sénescence et l'induction de son acteur principal p21 sont exacerbées en sa présence, ce qui indique que p53 favorise l'entrée en sénescence provoquée par la disparition de ZNF768. Cette observation aux premières allures déconcertantes peut être expliquée par une réponse apoptotique plus élevée en l'absence de p53 (voir Figure 5). En effet, l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 est fortement dépendante de p53 et celui-ci est connu pour affecter négativement l'apoptose (voir partie 2.2.2) (Besson et al., 2008). D'ailleurs, toujours en comparant des lignées cellulaires HCT116 sauvages et mutées pour p53, nous avons mesuré une réponse apoptotique plus élevée dans les lignées mutées en réponse à la perte de ZNF768 (voir Figure 5).

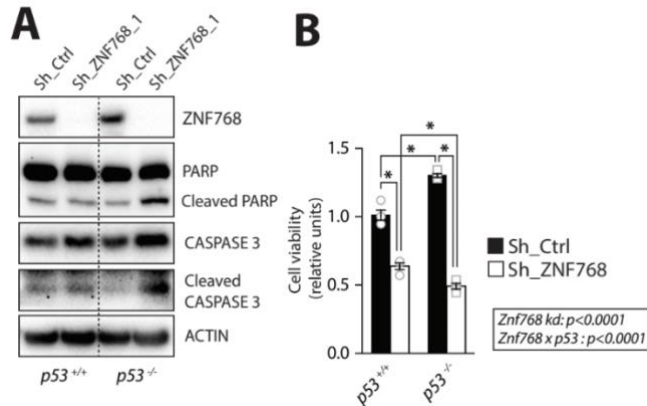


Figure 5: Induction de l'apoptose en réponse à la déplétion de ZNF768 selon le statut sauvage ou nul de p53.

En A, des cellules HCT116 sauvages et p53 nulles ont été infectées pour dépléter ZNF768, le clivage des marqueurs apoptotiques caspase 3 et PARP ont ensuite été révélés par immunobuvardage de type western blot. En B, dans les mêmes conditions expérimentales, la viabilité cellulaire a été évaluée en quantifiant par colorimétrie la conversion du sel de tétrazolium en formazan par la mitochondrie (n=4/condition). La coloration obtenue est proportionnelle à la viabilité cellulaire.

2.3 Les signaux de stress inducteurs de sénescence cellulaire entraînent une diminution de ZNF768.

2.3.1 Les niveaux de ZNF768 sont diminués dans la sénescence répllicative et prématurée.

Étant donné que la diminution de ZNF768 déclenche la sénescence cellulaire, nous nous sommes interrogés sur le comportement de ZNF768 dans le contexte de sénescence cellulaire en générale. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la sénescence répllicative est principalement déclenchée par l'attrition des télomères qui a lieu à chaque doublement cellulaire et peut être associée à l'« âge » de la cellule. La sénescence peut aussi être induite prématurément par l'activation des oncogènes (sénescence induite par les oncogènes) et l'exposition aux composés génotoxiques (sénescence induite par le stress). Nous avons observé que les niveaux de ZNF768 sont fortement réduits dans ces trois contextes de sénescence, ce qui nous permet de proposer l'abondance de ZNF768 comme un nouvel indicateur de sénescence cellulaire, qui pourra être utilisé en combinaison avec les marqueurs bien établis. Actuellement, aucun marqueur exclusif à la sénescence n'a encore été identifié du fait de la forte hétérogénéité des différents types de sénescence. Même si l'activité de la β -galactosidase et l'expression de p16 sont communément utilisés, certaines cellules comme les macrophages par exemple expriment p16 sans être en sénescence. Bien que d'avantage d'investigations soient nécessaires, il est possible que les niveaux de ZNF768 soient un marqueur universel de la sénescence cellulaire.

2.3.2 Le stress génotoxique mobilise l'axe PI3K/AKT et le protéasome pour déclencher la dégradation de ZNF768.

En constatant l'importante et rapide dégradation de ZNF768 suivant l'exposition à une faible dose de doxorubicine, nous avons souhaité investiguer en détails le rôle de l'axe RAS/PI3K dans ce processus. Il a déjà été montré qu'une sous population nucléaire de la kinase AKT est activée en cas de dommages à l'ADN par phosphorylation sur les résidus Ser473 et Thr308 (Brown et al., 2015). Pour quantifier ces phosphorylations, il est important de cultiver les cellules dans un milieu dépourvu de facteurs de croissance, au moins 24h avant l'exposition aux agents génotoxiques (Brown et al., 2015). De cette façon, nous avons constaté que la diminution de ZNF768 prend place dans les quelques heures qui suivent l'exposition à la doxorubicine et suit une anti-corrélation quasi parfaite avec la phosphorylation croissante d'AKT. Nous avons démontré que le blocage pharmacologique du protéasome ou de la kinase AKT permet de prévenir la dégradation de ZNF768 induite par l'exposition à la doxorubicine. De manière intéressante, le blocage pharmacologique des MAPKs kinases prévient aussi cette dégradation, ce qui démontre qu'AKT n'est pas le seul acteur dans ce phénomène (voir Figure 6).

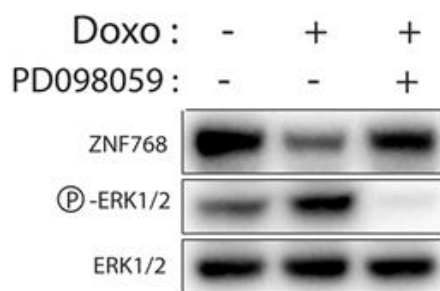


Figure 6: L'inhibition pharmacologique des MAPKs kinases (ERK1/2) prévient la dégradation de ZNF768 induite par le stress génotoxique.

On constate ici que le point commun entre la sénescence induite par les oncogènes et le stress génotoxique est que ces deux types de sénescence impliquent une mobilisation des voies oncogéniques RAS/MAPK et/ou PI3K/mTORC2/AKT pour déstabiliser ZNF768. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la dégradation des protéines associée à la sénescence est un phénomène qui met en relation une forte activité de la voie RAS/MAPK et la dégradation intensive de diverses protéines souvent impliquées dans la prolifération. Nous avons démontré dans l'article présenté ici que ZNF768 est soumise à une dégradation importante en cas de suractivation de ce sentier de signalisation, et que sa déplétion impacte la prolifération au point de déclencher l'entrée en sénescence. Par ces observations, nous proposons que ZNF768 est une nouvelle cible de la dégradation des protéines associée à la sénescence. Nous avons aussi démontré que les niveaux de

ZNF768 sont réduits dans les cellules IMR90 en sénescence réplivative. Bien que ce type de sénescence repose sur l'attrition des télomères, plusieurs études supposent une contribution importante de la voie mTORC1 dans ce processus (El Maï et al., 2020; Tan et al., 2016). Il sera intéressant d'investiguer l'impact de ce sentier sur les niveaux de ZNF768 lors de l'entrée en sénescence réplivative et définir si ce dernier y contribue.

De manière intéressante, nous avons constaté que la dégradation de ZNF768 est intensifiée par l'augmentation de la concentration en doxorubicine (voir Figure 7). Alors qu'une dose légère de doxorubicine (0.1 μM) induit une dégradation d'environ 50% des niveaux de ZNF768, on constate qu'une augmentation à 1 μM provoque une déplétion beaucoup plus rapide et profonde (voir Figure 7 A-B). La disparition de ZNF768 semble totale lorsque qu'on augmente la concentration de doxorubicine à 10 μM (voir Figure 7 A-B). Ce résultat nous rappelle nos observations précédentes suggérant l'existence d'un seuil critique des niveaux de ZNF768 dans la bascule de la sénescence vers l'apoptose (voir partie 2.2.1). En effet, on constate qu'à 24h d'exposition à 1 et 10 μM de doxorubicine, les cellules sont clairement en apoptose comme l'indique le clivage de PARP comparé à la dose de 0.1 μM , ou les niveaux très haut de p21 et le profil de PARP indique un arrêt du cycle cellulaire probable mais sans apoptose apparente (voir Figure 7 A-B).

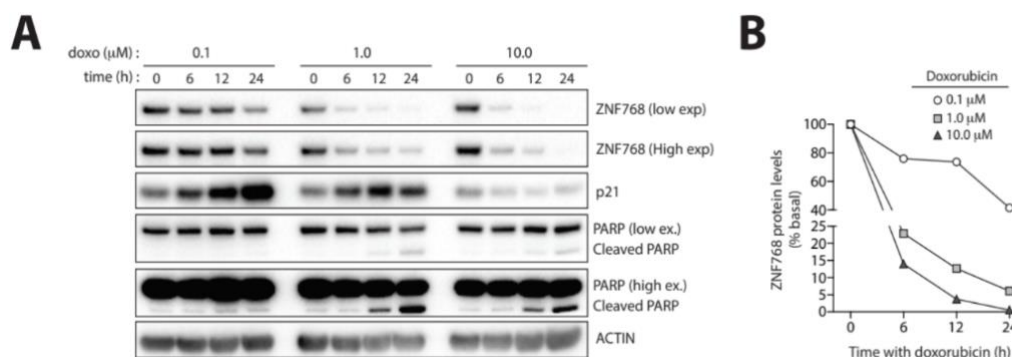


Figure 7: La diminution de ZNF768 induite par le stress génotoxique est proportionnelle à la dose de doxorubicine.

En A, des cellules HCT116 ont été exposées à une dose croissante de doxorubicine (0.1, 1 et 10 μM) durant les temps indiqués. Par la suite, les niveaux de ZNF768 ont été quantifiés à partir des protéines extraites et analysées par immunobuvardage de type western blot (A-B).

Ces résultats bien que très préliminaires supposent une relation intéressante entre ZNF768 et la décision d'entrée en sénescence ou en apoptose, deux voies conceptuellement opposées. Il sera intéressant à l'avenir d'évaluer plus en détail la dynamique de ZNF768 lors de l'entrée en apoptose notamment par immunohistochimie afin de savoir si la dégradation critique prend place avant ou

pendant le processus apoptotique. Par la suite, il sera intéressant d'évaluer le rôle de ZNF768 sur l'entrée en apoptose notamment par des expériences de surexpression.

3. ZNF768 diminue certains phénotypes associés à la sénescence.

En observant l'importante dégradation de ZNF768 durant la sénescence, une question importante s'est posée : la diminution de ZNF768 est-elle un prérequis pour l'établissement de la sénescence, ou simplement une conséquence? Pour répondre à cette question, nous avons surexprimé simultanément ZNF768 et RAS dans des fibroblastes primaires murins ainsi que dans la lignée IMR90. Afin d'évaluer l'impact de ZNF768 sur la sénescence, nous avons dénombré les cellules positives pour la β -galactosidase, ce qui reste le marqueur universel le plus utilisé pour détecter les cellules sénescents. Dans les deux modèles cellulaires utilisés, nous avons constaté que la surexpression de ZNF768 diminue significativement le nombre de cellules positives pour la β -galactosidase indiquant que ZNF768 réprime la sénescence induite par RAS. Afin de décomposer les mécanismes moléculaires impliqués, nous avons utilisé les oncoprotéines E6 et E7 du papillomavirus, connues pour supporter la carcinogénèse en interférant par fixation directe avec l'activité de p53 (via E6) et de pRB (via E7) respectivement (Jones et Münger, 1996 ; Scheffner et al., 1990). De manière intéressante, nous avons constaté que ZNF768 diminue le nombre de cellules sénescents en coopération avec E7 et non avec E6. Ces résultats indiquent que ZNF768 affecte la sénescence en interférant avec la voie p53 lorsque pRB est inactivé.

4. ZNF768, un adversaire de plus pour p53.

Tel que nous l'avons mentionné précédemment, la surexpression de ZNF768 aide à diminuer la sénescence induite par RAS d'une façon principalement dépendante de p53. De plus, nous avons constaté en comparant des cellules au profil p53 sauvage et muté, que la sénescence induite par la déplétion de ZNF768 nécessite fortement la présence de p53. Nous avons donc effectué une panoplie d'expériences afin d'évaluer l'impact de ZNF768 sur l'activité de p53.

4.1. ZNF768 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53.

En utilisant la doxorubicine, nous avons observé que la diminution de ZNF768 améliore l'expression de plusieurs gènes régulés par p53. Afin d'évaluer plus spécifiquement l'activité de p53, nous avons utilisé l'inhibiteur pharmacologique Nutlin3a, qui permet d'activer p53 en absence de stress par le blocage de son association avec MDM2 (Vassilev et al., 2004). En utilisant des doses

croissantes de Nutlin3a, nous avons observé que la déplétion de ZNF768 favorise l'expression génique de plusieurs cibles transcriptionnelles de p53. À l'inverse, la surexpression de ZNF768 réprime l'induction de la plupart de ces gènes. Par ces expériences, nous avons conclu que ZNF768 réprime l'activité de p53. De même, dans un contexte de sénescence induite par la doxorubicine à faibles doses, nous avons constaté que l'expression génique des marqueurs de sénescence *p21*, *PAIL* et *BTG2*, régulés par p53, sont réduits par la surexpression de ZNF768. Les niveaux de p53 dans ces conditions sont diminués alors qu'ils restent inchangés lors d'un traitement de courte durée à la doxorubicine, cela suggère que ZNF768 contrôle des mécanismes qui affectent la stabilité de p53 au long terme.

4.2. *ZNF768 interagit avec p53 et affecte son état de phosphorylation.*

Dans le but d'investiguer les mécanismes par lesquels ZNF768 affecte p53, nous avons mesuré les niveaux de p53 ainsi que certaines de ces phosphorylations suivant un traitement court à la doxorubicine avec la déplétion de ZNF768. Dans ces conditions, nous n'avons pas remarqué de variations significatives et reproductibles des niveaux totaux de p53. Néanmoins, nous avons constaté une augmentation d'au moins deux phosphorylations de p53 (les sérines 15 et 33) placées dans son extrémité N-terminale. En opposition, la surexpression de ZNF768 réprime significativement la phosphorylation de la sérine 15. Étant donné que ces résidus sont fortement phosphorylés en réponse aux dommages à l'ADN, nous avons contrôlé les niveaux de phosphorylation (relatif à l'activité) des deux principales kinases responsables de ces phosphorylations, CHK1 et CHK2, et nous n'avons pas remarqué de différences dans la phosphorylation de ces kinases. Ces résultats suggèrent que l'impact de ZNF768 sur la phosphorylation de p53 n'est pas dû à une accumulation plus intense ou plus faible de dommages à l'ADN.

Par la suite, nos expériences d'immunoprécipitation suivies d'analyses par spectrométrie de masse (SM) et par western blot ont révélé une interaction physique entre les facteurs de transcription p53 et ZNF768. Les domaines à doigts de zinc sont essentiels pour la fixation de ZNF768 à p53, de même que le domaine de transactivation transcriptionnelle et l'extrémité C-terminale de p53. Le domaine CTD de ZNF768 n'est pas essentiel à cette interaction. De manière intéressante, l'impact de ZNF768 sur la phosphorylation de p53 est perdu par le retrait des domaines à doigts de zinc, ce qui indique que ZNF768 affecte la phosphorylation de p53 par fixation directe.

4.3. *Hypothèses sur l'interaction fonctionnelle entre ZNF768 et p53.*

Nous avons mis en évidence un rôle de ZNF768 dans la sénescence cellulaire dépendante de p53. En plus d'avoir constaté un impact négatif de ZNF768 sur l'expression de plusieurs gènes sous

contrôle de p53, nous avons caractérisé une interaction physique entre ces deux facteurs de transcription. P53 est connu pour moduler la transcription de certains gènes en se fixant au CTD de RPB1 (Borsos et al., 2017; Kim et al., 2011). Bien que le domaine CTD de ZNF768 ne soit pas indispensable à cette interaction, celui-ci semble important pour la stabiliser car le retrait du CTD diminue légèrement la quantité de p53 immunoprécipitée par ZNF768.

Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription régulé et dirigé vers ces différentes cibles transcriptionnelles par diverses modifications post-traductionnelles ayant lieu à toute part de la protéine (Meek et Anderson, 2009). Ces dernières incluent de nombreuses phosphorylations, acétylations, méthylations, ainsi que des ubiquitinations et même des modifications moins courantes comme l'ADP ribosylation et la glycosylation (Kruse et Gu, 2008).

ZNF768 affecte la phosphorylation du domaine N-terminale de p53, au moins sur les résidus Ser15 (S15) et Ser33 (S33). Cet effet semble se répercuter sur la transcription de plusieurs cibles canoniques de p53, incluant des acteurs primordiaux de la sénescence comme *p21*, *PAIL* et *BTG2*. L'extrémité N-terminale de p53 (acides aminés 1 à 60) est nécessaire à son interaction avec ZNF768 et contient l'essentiel des résidus phosphorylés (Kruse et Gu, 2008). La phosphorylation de la sérine 15, en synergie avec d'autres phosphorylations de l'extrémité N-terminale, contribue à augmenter la stabilité de p53 en gênant son interaction avec MDM2 (Loughery et al., 2014). Cependant, cette phosphorylation est aussi importante pour améliorer l'activité transcriptionnelle de p53 dans son contexte chromatinien (Loughery et al., 2014). Il existerait un rôle des modifications post-traductionnelles de p53 dans les cellules non stressées, lorsque ses niveaux sont très bas et son activité plus ou moins sous silence (Loughery et al., 2014). Il est envisageable que ZNF768 masque d'une certaine manière cette portion de p53, et empêche l'accès aux kinases responsables de sa phosphorylation.

Au-delà des effecteurs, les effaceurs de modifications post-traductionnelles sont très importants pour renverser la transduction d'un signal. Concernant p53, plusieurs phosphatases interviennent dans sa déphosphorylation afin de limiter son activité à une fenêtre temporelle précise et permettre la reprise du cycle cellulaire (Donehower, 2014 ; Shaltiel et al., 2014). La phosphatase PP1 (Protein Phosphatase 1), dont la sous-unité catalytique est amplifiée dans certains cancers, est connue pour déphosphoryler la sérine 15 de p53, tandis que d'autres phosphatases comme DUSP26 (Dual-Specificity Phosphatase 26) déphosphorylent les sérines 20 et 37 (Donehower, 2014). Par nos expériences d'immunoprécipitation suivies d'analyses par spectrométrie de masse (SM), nous avons constaté que ZNF768 interagit avec la phosphatase PP6 (Protein Phosphatase 6) (voir Figure 8).

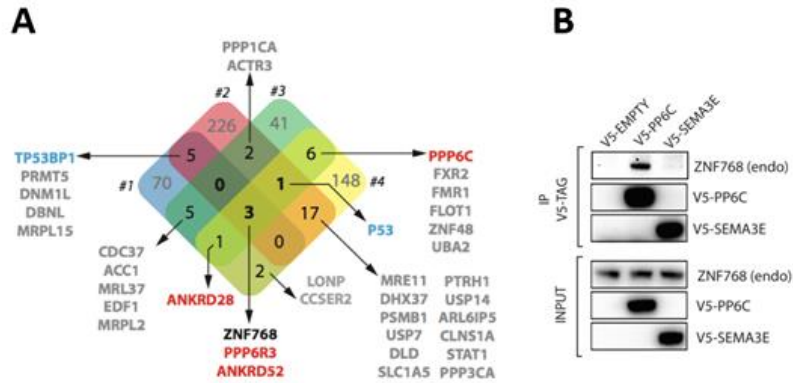


Figure 8: ZNF768 interagit avec l'holoenzyme PP6.

(A) Représentation des partenaires protéiques potentiels de ZNF768 identifiés par SM dans des cellules HEK. (B) Western blot montrant l'immunoprécipitation de ZNF768 avec la sous-unité catalytique PP6c de PP6.

PP6 est une holoenzyme à activité phosphatase envers les sérines et thréonines phosphorylées (Ser/Thr phosphatase) (Ohama, 2019). PP6 est membre de la famille des Ser/Thr phosphatases PPP qui comprend PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP7 et PP6 (Ohama, 2019). L'holoenzyme PP6 est composée d'une sous unité catalytique (PP6c) qui s'assemble avec une sous-unité régulatrice (parmi PP6R1, PP6R2 ou PP6R3) et une sous-unité adaptatrice parmi les suivantes : ANKRD28 (Ankyrin Repeat Domain 28), ANKRD44 (Ankyrin Repeat Domain 44) et ANKRD52 (Ankyrin Repeat Domain 52) (Ohama, 2019). En fonction des différentes combinaisons d'assemblage, l'activité de PP6 est modulée et il semble par exemple que la sous-unité ANKRD28 soit impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire ce qui n'est pas le cas de la sous-unité ANKRD52 (Ohama, 2019). Nous avons identifié plusieurs sous-unités adaptatrices de PP6 (ANKRD28 et ANKRD52) dans nos expériences de SM ce qui indique que ZNF768 interagit avec différents complexes PP6, possiblement en fonction du cycle cellulaire. Contrairement à PP2A, il existe peu de documentation sur le rôle de PP6. Cette dernière est connue pour jouer un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN notamment sur la déphosphorylation de γ H2Ax, un variant d'histone phosphorylé en cas de stress génotoxique (Zhong et al., 2011). Bien que cela n'ait jamais été mis en évidence, il est possible que p53 soit un substrat de PP6. Nous proposons ainsi un modèle dans lequel ZNF768 pourrait contribuer à réduire la phosphorylation et l'activation de p53 en servant de lien entre PP6 et p53. Des expériences futures sont requises pour tester cette possibilité.

5. ZNF768 est surexprimée dans certains cancers, une piste thérapeutique?

Nous avons mis en évidence par l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse, que les niveaux de ZNF768 doivent être suffisamment abondants pour maintenir la prolifération et éviter une entrée en sénescence. De plus, la surexpression de ZNF768 diminue certains phénotypes associés à la sénescence par des mécanismes qui dépendent en majorité de p53. Puisque la prolifération et la sénescence cellulaire sont deux paradigmes hautement importants dans la carcinogénèse, nous avons décidé de mesurer les niveaux de ZNF768 en contexte tumoral. Pour cela, nous avons utilisé les données en ligne du site cBioPortal, une ressource libre d'accès qui recense les données génomiques de plus de 5000 échantillons de tumeurs (Cerami et al., 2012). Bien que l'on constate que les mutations dans *znf768* ne sont pas très fréquentes, nous notons que 50% d'entre elles sont des amplifications (50.5 % de toutes les mutations), les délétions étant particulièrement rares (0.05% des mutations). De plus, nous avons observé en utilisant une autre ressource en ligne (GEPIA), que les niveaux d'ARN messagers de ZNF768 sont généralement plus élevés dans le cancer. Afin de confirmer ces observations par voie expérimentale, nous avons quantifié les niveaux de ZNF768 par immunobuvardage de type western blot dans des extraits protéiques collectés à partir de tumeurs du poumon, incluant des adénocarcinomes LUAD (Lung Adenocarcinoma) et des carcinomes squameux ou épidermoïdes LUSC (Lung Squamous Cell carcinoma). Nos résultats sont sans équivoque et montrent une augmentation parfois spectaculaire de ZNF768 dans les tumeurs. Bien que l'on constate une forte hétérogénéité, avec des niveaux parfois indétectables de ZNF768, nous n'avons pas observé de diminution de ZNF768 dans les tumeurs en comparaison au tissu sain. Des résultats similaires ont été obtenus par immunohistochimie et montrent un signal intense de coloration nucléaire de ZNF768 dans les cellules cancéreuses issues de LUAD et de LUSC. Dans une précédente étude, des auto-anticorps spécifiques du cancer et dirigés contre ZNF768 ont été décrits dans le cas du cancer colorectal, et associés à un mauvais pronostic de survie (O'Reilly et al., 2015). Les auto-anticorps spécifiques du cancer sont produits par le système immunitaire en réponse à l'expression aberrante de protéines endogènes éventuellement mutées (Tan et Zhang, 2008). Cela suggère qu'il existe de fréquentes dérégulations de ZNF768 dans le cancer du côlon, menant à la production d'auto-anticorps.

Vue d'ensemble, ces résultats indiquent que les cellules cancéreuses ont une tendance à surexprimer ZNF768 ou au moins à maintenir ses niveaux. Les mécanismes en jeu peuvent être transcriptionnels et/ou post-traductionnels. Les cellules cancéreuses sont soumises à des niveaux de stress importants, avec généralement des dommages à l'ADN intenses et une activation très soutenue des voies oncogéniques RAS et PI3K. Il est possible qu'une pression de sélection opère lors de la

transformation tumorale pour contrebalancer les effets déstabilisants du stress génotoxique et/ou oncogénique sur ZNF768 et maintenir une prolifération efficace. Les cellules ayant maintenu ou surélevé les niveaux de ZNF768 pourraient disposer d'un avantage, étant donné l'importance de ce facteur de transcription dans la prolifération cellulaire. De manière générale, des expériences de séquençage de nombreuses tumeurs pourraient apporter des renseignements précieux sur le contexte moléculaire dans lequel les niveaux de ZNF768 sont surélevés. Cela permettrait peut-être d'identifier quelle pression de sélection opère sur ZNF768 et dans quelle mesure celui-ci peut servir de biomarqueur dans le cancer. Par ailleurs, les agents génotoxiques comme la doxorubicine sont utilisés pour freiner la progression du cancer en induisant la sénescence cellulaire. Les niveaux de ZNF768 pourraient être informatifs sur la réponse de certains cancers aux traitements de chimiothérapie.

6. Importance de ZNF768 dans le cycle cellulaire : un rôle mitotique?

Bien que les fonctions transcriptionnelles de ZNF768, englobant son impact sur p53, sont probablement la composante principale de son rôle dans la sénescence et la prolifération, on ne peut exclure un éventuel rôle mitotique. En effet, nous avons mis en évidence que la déplétion de ZNF768 affecte fortement l'exécution de la mitose. En plus de constater une chute drastique de l'index mitotique dans les populations cellulaires dépourvues de ZNF768, on y observe de nombreux défauts de ségrégation des chromosomes et autres défauts liés à la division cellulaire. Bien sûr, de nombreux facteurs sont susceptibles de provoquer des erreurs en mitose, et les conséquences générales de la disparition de ZNF768 sur ce processus peuvent être indirectes. Grâce aux renseignements fournis par Metascope, nous savons que ZNF768 est importante pour maintenir l'expression de gènes jouant des rôles clés dans la division cellulaire. Il est donc probable que l'impact mitotique provoqué par la déplétion de ZNF768 soit exclusivement lié à son statut de facteur de transcription. Néanmoins, un doute persiste concernant son ou ses éventuel(s) rôle(s) non transcriptionnel(s).

6.1. Les niveaux de ZNF768 sont régulés par le cycle cellulaire et atteignent un minimum en mitose.

Dans le but d'investiguer un éventuel rôle de ZNF768 dans la progression du cycle cellulaire, nous avons étudié dans un premier temps sa régulation au cours d'un cycle complet. Pour cela, des cellules HeLa ont été synchronisées en phase G1 avec de la thymidine, puis suivies sur un demi-cycle cellulaire. De manière intéressante, nous avons constaté que ZNF768 est une protéine particulièrement régulée au cours du cycle cellulaire, dont les niveaux protéiques sont élevés en phase G1/S, et chutent durant la mitose (voir Figure 9 A). Par la suite, nous avons synchronisé plusieurs

lignées cellulaires en phase G2/M, à la frontière mitotique, à l'aide d'un inhibiteur de CDK1, le RO3306 (Vassilev et al., 2006). On constate que les niveaux de ZNF768 sont encore abondants en phase G2, mais chutent brusquement dès l'entrée en mitose (voir Figure 9 B à gauche). L'ajout de MG132 lors du relargage de cellules synchronisées en phase G2/M limite la disparition de ZNF768 durant la mitose, ce qui indique une dégradation dépendante du protéasome (voir Figure 9 B à droite). Enfin, nous avons constaté que la quantité résiduelle de ZNF768 dans les cellules synchronisées au Taxol présente un retard sur gel, ce qui suggère un patron de modifications post-traductionnelles spécifique à la mitose (Figure 9 C).

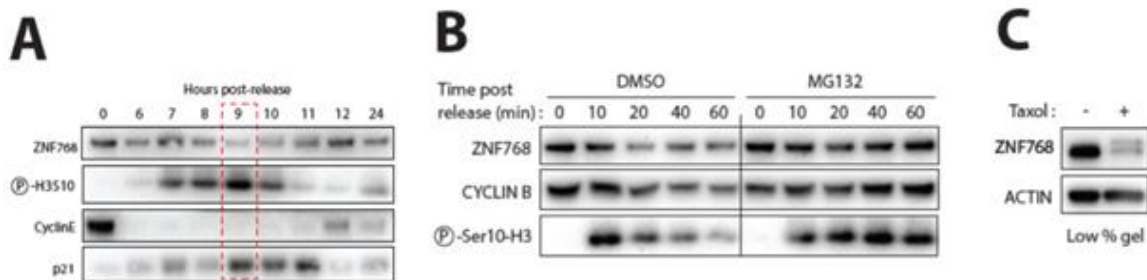


Figure 9: ZNF768 est dégradée en mitose par un mécanisme dépendant du protéasome.

Les cellules HeLa ont été synchronisées en phase G1 avec de la thymidine (A), en phase G2/M avec l'inhibiteur de CDK1 RO3306 (B), puis relâchées selon les temps indiqués avec ou sans MG132 (A-B). En C, Les cellules HeLa ont été synchronisées au Taxol (C). Dans chaque expérience, les protéines ont été récoltées et analysées par western blot.

La mitose et la progression dans le cycle cellulaire en générale sont actionnées par la dégradation protéolytique de nombreuses protéines via des mécanismes basés sur l'ubiquitine (Koepp, 2014). Par exemple, l'anaphase requière la dégradation protéolytique de la sécurine qui permet la ségrégation finale des chromatides sœurs (Koepp, 2014). Il est possible que ZNF768 joue un rôle fonctionnel et/ou régulateur lors de la mitose, étant donné que sa perte s'accompagne de défauts importants de ségrégation des chromosomes. Il a été mis en évidence que l'exécution de la mitose nécessite le relargage complet de la chromatine de nombreuses protéines à doigts de zinc par la phosphorylation d'une thréonine sur un motif conservé appelé « lien » (de l'anglais linker) et composé de la séquence d'acides aminés Thr-Gly-Glu-Lys-Pro (TGEKP) (Rizkallah et al., 2011). Ce motif est présent sur ZNF768 entre les résidus 264-268. Il serait intéressant de vérifier si ce motif présent sur ZNF768 est effectivement phosphorylé lors de la mitose et s'il contribue à sa dégradation. Néanmoins, même si la dissociation des protéines à doigts de zinc de la chromatine est un fait commun, la dégradation importante de ZNF768 l'est beaucoup moins, et suggère alors que celle-ci est importante dans le processus mitotique.

6.2. *ZNF768 interagit avec des composants protéiques du centromère et occupe possiblement ce compartiment.*

Pour appuyer cette hypothèse, on peut noter que ZNF768 semble interagir avec des composants du centromère, un compartiment clé du chromosome qui orchestre la ségrégation des chromatides (Bloom et Costanzo, 2017). On constate sur le site en ligne Biogrid que ZNF768 a été identifié comme un potentiel interactant de NDC80 (Nuclear Division Cycle 80), un composant des kinétochores externes important pour la jonction entre le centromère et les microtubules (<https://thebiogrid.org/122839/summary/homo-sapiens/znf768.html>)(McClelland et al., 2003). La protéine SgoI (Shugoshin) apparait aussi comme potentiel partenaire de ZNF768. Cette protéine joue un rôle capital dans la stabilité du génome en prévenant la dissociation prématurée des chromatides sœurs (« shugoshin » signifiant ‘gardien’) (Watanabe, 2005). Pour cela, Sgo1 recrute PP2A afin de retirer certaines phosphorylations déstabilisatrices de la cohésion des chromatides, pour retarder leur séparation (Watanabe, 2005). Nous rappelons ici que ZNF768 interagit de façon certaine avec PP6, la phosphatase la plus apparentée à PP2A après PP4, en termes de séquence (Ohama, 2019). Pour finir, l'étude récente publiée par Rohrmoser et ses collaborateurs indique que ZNF768 interagit avec CENP-E (Centromere-associated Protein E), un autre composant des kinétochores important pour la liaison aux microtubules (Rohrmoser et al., 2019 ; Yu et al., 2019). De telles possibilités d'interactions suggèrent que ZNF768 occupe le centromère ou du moins une place proche de celui-ci. D'ailleurs, en couplant ZNF768 à une molécule fluorescente, nous avons observé des colocalisations intéressantes entre ZNF768 et le centromère (voir Figure 10).

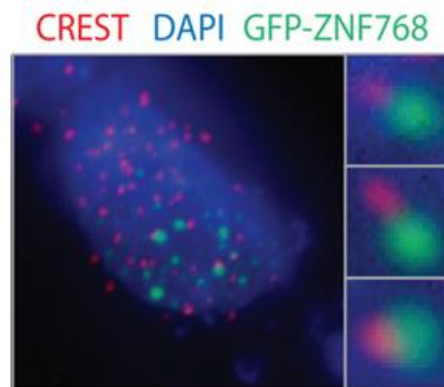


Figure 10: *ZNF768 est enrichie au centromère.*

Immunofluorescences avec l'anticorps CREST ciblant divers composants centromériques après expression transitoire (48h) de ZNF768 couplée à un marqueur GFP.

Ces résultats préliminaires suggèrent une proximité entre ZNF768 et certains composants des kinétochores. Ainsi, le facteur de transcription ZNF768 pourrait-il jouer un rôle dans la régulation des points de contrôles mitotiques? La phosphatase PP6, dont le rôle en mitose est certifié est-elle impliquée? La dégradation mitotique de ZNF768 est-elle nécessaire à l'exécution d'une mitose efficace? Beaucoup de questions émergent à la lumière de ces résultats. Il est aujourd'hui clair qu'une protéine ne peut avoir qu'un seul rôle, et il apparaît très probable que la fonction transcriptionnelle de ZNF768 ne soit pas l'unique raison de son importance dans la prolifération cellulaire.

7. Hypothèses sur les origines évolutives de ZNF768.

Au-delà du rôle de ZNF768 dans le contrôle de la prolifération et de son implication possible dans le cancer, il faut rappeler que ZNF768 est jusqu'ici très peu étudiée. Actuellement, une seule étude parue dans le journal *Nucleic Acids Research* en 2019 s'est attelée à sa caractérisation (Rohrmoser et al., 2019). Cette étude décrit un facteur de transcription important pour la prolifération dont les cibles transcriptionnelles sont plus exprimées que la moyenne des autres gènes (Rohrmoser et al., 2019).

Par ailleurs, ZNF768 a un profil de conservation intrigant. Bien que le gène ZNF768 présente 111 orthologues et 56 paralogues, ZNF768 a évolué chez les mammifères. La section de ZNF768 contenant les domaines à doigts de zinc est quasiment identique entre les mammifères placentaires et les marsupiaux (96%), mais est beaucoup plus divergente chez l'ornithorynque (57.5%), l'un des derniers représentant des monotrèmes (Rohrmoser et al., 2019). De plus, on constate d'après le site en ligne NCBI que d'autres espèces de monotrèmes comme les échidnés (de leurs nom scientifique *Tachyglossidae*) ne semblent pas présenter d'homologue de ZNF768. Ces observations soulèvent un premier questionnement sur les raisons évolutives ayant amené à conserver ZNF768 chez les mammifères placentaires et les marsupiaux en particulier, et non chez les monotrèmes. Pour ajouter un palier de complexité supplémentaire, le domaine CTD n'est présent que chez les mammifères placentaires mais pas chez les marsupiaux (Rohrmoser et al., 2019). Si la présence du domaine CTD améliore l'activité transcriptionnelle de ZNF768 comme Rohrmoser et ses collaborateurs le suggèrent, quelles sont les forces évolutives ayant conduit à la sélection de ce domaine CTD chez les mammifères placentaires?

Contrairement aux monotrèmes, les mammifères placentaires et les marsupiaux disposent d'un placenta, un organe de connexion entre l'embryon et la muqueuse utérine qui assure les échanges de nutriments et d'oxygène pour supporter le développement embryonnaire (Roberts et al., 2016). Ce

qui différencie principalement les mammifères placentaires des marsupiaux est la durée et l'importance relative de la placentation comparée à l'allaitement lors du développement du juvénile (Abbot et Capra, 2017). Chez les marsupiaux, le placenta se forme plus tardivement et la gestation est brève (Abbot et Capra, 2017). Les jeunes marsupiaux naissent prématurés et restent étroitement associés à la mère jusqu'à la fin de leurs développement (Abbot et Capra, 2017). Dans ces conditions, la lactation est plus longue et particulièrement centrale au développement (Abbot et Capra, 2017). La gestation chez les mammifères placentaires est plus longue que chez les marsupiaux, cela dû à un placenta plus développé, prenant place très tôt dans le développement de l'embryon (Abbot et Capra, 2017). Les mécanismes moléculaires responsables de ces divergences ne sont pas bien compris et plusieurs gènes impliqués à la fois dans la lactation des marsupiaux et dans le développement du placenta chez les mammifères placentaires ont été identifiés (Abbot et Capra, 2017). ZNF768 est-il impliqué dans le développement du placenta et/ou dans le développement des mammifères placentaires? Des études *in vivo* avec des modèles transgéniques permettant la répression ou la surexpression de ZNF768 pourront permettre de répondre à cette question.

Enfin, il sera intéressant de retracer l'histoire évolutive de ZNF768 par homologie de séquence afin d'identifier, dans la mesure du possible, les gènes apparentés les plus anciens. Comme pour p53, l'étude phylogénique de ZNF768 pourrait apporter des informations cruciales sur ses fonctions.

Conclusion

Dans cette présente thèse, nous avons démontré que ZNF768 est un facteur de transcription très important pour la prolifération dont l'activité est nécessaire pour maintenir l'expression de gènes impliqués, entre autres, dans le cycle cellulaire. La déplétion de ZNF768 se traduit par une entrée en sénescence, un état d'arrêt généralement irréversible de la prolifération pouvant être déclenché par le stress génotoxique et l'activité aberrante de voies oncogéniques comme l'axe RAS/PI3K. Nos travaux ont mis en évidence que l'axe RAS/PI3K converge vers une régulation négative de ZNF768 au niveau post-traductionnel, par des mécanismes qui impliquent les voies des MAPs kinases et mTORC2/AKT. Les dommages à l'ADN déstabilisent ZNF768 par des mécanismes qui dépendent, au moins en partie, du protéasome et de la kinase AKT. De manière intéressante, ZNF768 est aussi déplétée dans les cellules en sénescence répllicative, ce qui suggère que cette nouvelle protéine à doigts de zinc peut être utilisée comme biomarqueur de la sénescence cellulaire. ZNF768 interagit physiquement avec le suppresseur de tumeur p53 et aide à contourner la sénescence induite par les oncogènes par un ou plusieurs mécanismes dépendants de ce facteur de transcription. Bien que le rôle de ZNF768 dans l'établissement de la sénescence et son éviction dépendent probablement de plusieurs mécanismes, nous avons démontré que ZNF768 affecte négativement certaines phosphorylations de p53 et inhibe son activité transcriptionnelle. Enfin, nos travaux ont révélé que les niveaux de ZNF768 sont augmentés dans les cellules cancéreuses, au niveau transcriptionnel et/ou post-traductionnel, ce qui est cohérent avec nos découvertes précédentes et suggèrent un rôle de ZNF768 dans la carcinogénèse. Davantage d'études sont nécessaires pour identifier la ou les causes qui poussent les cellules cancéreuses à maintenir des niveaux élevés de ZNF768. Ces travaux représentent des découvertes importantes et ouvrent des opportunités de recherche en cancérologie où les mécanismes qui contrôlent la sénescence sont au cœur des investigations. Au-delà du cancer, ZNF768 est une nouvelle protéine qui présente un patron de conservation intrigant dans le règne des mammifères. Nous sommes en mesure de nous questionner sur son rôle éventuel dans la diversification des mammifères placentaires, à la vue de l'apparition du domaine CTD chez ce clade spécifiquement.

Bibliographie

Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400–414.

Abbot, P., and Capra, J.A. (2017). What is a placental mammal anyway? *ELife* 6.

Alexander, P.B., Yuan, L., Yang, P., Sun, T., Chen, R., Xiang, H., Chen, J., Wu, H., Radloff, D.R., and Wang, X.-F. (2015). EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence. *Cell Res* 25, 135–138.

American Cancer Society. (2020). <https://www.cancer.org/>. Consulté le 10 avril 2020.

Awasthi, P., Foiani, M., and Kumar, A. (2015). ATM and ATR signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* 128, 4255–4262.

Bakhoun, S.F., and Cantley, L.C. (2018). The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. *Cell* 174, 1347–1360.

Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429.

Baugh, E.H., Ke, H., Levine, A.J., Bonneau, R.A., and Chan, C.S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ.* 25, 154–160.

Belyi, V.A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., and Levine, A.J. (2010). The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.

Berry, J.L., Polski, A., Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Murphree, A.L., and Gallie, B.L. (2019). The RB1 Story: Characterization and Cloning of the First Tumor Suppressor Gene. *Genes (Basel)* 10.

Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell* 14, 159–169.

Biran, A., Perelmutter, M., Gal, H., Burton, D.G.A., Ovadya, Y., Vadai, E., Geiger, T., and Krizhanovsky, V. (2015). Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev* 29, 791–802.

Bischof, O., Nacerddine, K., and Dejean, A. (2005). Human Papillomavirus Oncoprotein E7 Targets the Promyelocytic Leukemia Protein and Circumvents Cellular Senescence via the Rb and p53 Tumor Suppressor Pathways. *Mol Cell Biol* 25, 1013–1024.

Blackadar, C.B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol* 7, 54–86.

Blagosklonny, M.V. (2014). Geroconversion: irreversible step to cellular senescence. *Cell Cycle* 13, 3628–3635.

Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 149–160.

Bloom, K., and Costanzo, V. (2017). Centromere Structure and Function. *Prog Mol Subcell Biol* 56, 515–539.

Boehme, K.A., Kulikov, R., and Blattner, C. (2008). p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7785–7790.

Borsos, B.N., Huliák, I., Majoros, H., Ujfaludi, Z., Gyenis, Á., Pukler, P., Boros, I.M., and Pankotai, T. (2017). Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage. *Scientific Reports* 7, 40960.

- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell. Sci.* 123, 2527–2532.
- Brady, C.A., Jiang, D., Mello, S.S., Johnson, T.M., Jarvis, L.A., Kozak, M.M., Broz, D.K., Basak, S., Park, E.J., McLaughlin, M.E., et al. (2011). Distinct p53 Transcriptional Programs Dictate Acute DNA Damage Responses and Tumor Suppression. *Cell* 145, 571–583.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601.
- Brown, K.K., Montaser-Kouhsari, L., Beck, A.H., and Toker, A. (2015). MERIT40 is an Akt Substrate that Promotes Resolution of DNA Damage Induced by Chemotherapy. *Cell Rep* 11, 1358–1366.
- Campbell, P.M. (2014). Oncogenic Ras pushes (and pulls) cell cycle progression through ERK activation. *Methods Mol. Biol.* 1170, 155–163.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 50–83.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., and Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery* 3, 1–12.
- Castellano, E., and Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K. *Genes Cancer* 2, 261–274.
- Castellano, E., and Santos, E. (2011). Functional Specificity of Ras Isoforms. *Genes Cancer* 2, 216–231.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery* 2, 401.
- Chambard, J.-C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1299–1310.
- Chang, E.H., Gonda, M.A., Ellis, R.W., Scolnick, E.M., and Lowy, D.R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4848–4852.
- Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17, 590–603.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet.* 24, 289–296.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., and van Deursen, J.M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports* 15, 1139–1153.
- Cho, J.H., Kim, M.J., Kim, K.J., and Kim, J.-R. (2012). POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1 (PATZ1) inhibits endothelial cell senescence through a p53 dependent pathway. *Cell Death Differ.* 19, 703–712.
- Christou, C.M., and Kyriacou, K. (2012). BRCA1 and Its Network of Interacting Partners. *Biology (Basel)* 2, 40–63.
- Classon, M., Salama, S., Gorka, C., Mulloy, R., Braun, P., and Harlow, E. (2000). Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10820–10825.

- Cohet, N., Stewart, K.M., Mudhasani, R., Asirvatham, A.J., Mallappa, C., Imbalzano, K.M., Weaver, V.M., Imbalzano, A.N., and Nickerson, J.A. (2010). SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzyme ATPases Promote Cell Proliferation in Normal Mammary Epithelial Cells. *J Cell Physiol* 223, 667–678.
- Collado, M., and Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 472–476.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99–118.
- Cox, A.D., and Der, C.J. (2010). Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 1, 2–27.
- Criscione, S.W., Teo, Y.V., and Neretti, N. (2016). The Chromatin Landscape of Cellular Senescence. *Trends Genet.* 32, 751–761.
- Davalos, A.R., Coppe, J.-P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 29, 273–283.
- DeFilippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., and DiMaio, D. (2003). Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Virology* 77, 1551–1563.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Demidenko, Z.N., and Blagosklonny, M.V. (2008). Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* 7, 3355–3361.
- Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.-F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., et al. (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* 27, 900–915.
- Deschênes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.-F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2014). Cellular senescence and protein degradation. *Cell Cycle* 13, 1840–1858.
- van Deursen, J.M. (2019). Senolytic therapies for healthy longevity. *Science* 364, 636–637.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.
- Diehl, J.A., Zindy, F., and Sherr, C.J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11, 957–972.
- DiMauro, T., and David, G. (2010). Ras-induced Senescence and its Physiological Relevance in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 10, 869–876.
- Donehower, L.A. (2014). Phosphatases reverse p53-mediated cell cycle checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7172–7173.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221.
- El Mai, M., Marzullo, M., de Castro, I.P., and Ferreira, M.G. (2020). Opposing p53 and mTOR/AKT promote an in vivo switch from apoptosis to senescence upon telomere shortening in zebrafish. *ELife* 9, e54935.

- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8763–8767.
- Engeland, K. (2018). Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ.* 25, 114–132.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389–396.
- Eves, E.M., and Rosner, M.R. (2010). MAP kinase regulation of the mitotic spindle checkpoint. *Methods Mol. Biol.* 661, 497–505.
- Faguet, G.B. (2015). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer* 136, 2022–2036.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842–847.
- Favaudon, V. (2000). Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite. *Cancer/Radiothérapie* 4, 355–368.
- Ferbeyre, G. (2018). Aberrant signaling and senescence associated protein degradation. *Exp. Gerontol.* 107, 50–54.
- Fernández-Medarde, A., and Santos, E. (2011). Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* 2, 344–358.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083–1093.
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 36, 3943–3956.
- Flynn, R.L., and Zou, L. (2011). ATR: a Master Conductor of Cellular Responses to DNA Replication Stress. *Trends Biochem Sci* 36, 133–140.
- Fondation contre le cancer. (2020). <https://www.cancer.be/>. Consulté le 10 avril 2020.
- García, Z., Kumar, A., Marqués, M., Cortés, I., and Carrera, A.C. (2006). Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J* 25, 655–661.
- Giacinti, C., and Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25, 5220–5227.
- Gimple, R.C., and Wang, X. (2019). RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front Oncol* 9.
- Godbout, R., Dryja, T.P., Squire, J., Gallie, B.L., and Phillips, R.A. (1983). Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nature* 304, 451–453.
- Goodwin, E.C., Yang, E., Lee, C.-J., Lee, H.-W., DiMaio, D., and Hwang, E.-S. (2000). Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *PNAS* 97, 10978–10983.
- Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., et al. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179, 813–827.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harlen, K.M., and Churchman, L.S. (2017). The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 263–273.

- Hatakeyama, M., and Weinberg, R.A. (1995). The role of RB in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1, 9–19.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- Henley, S.A., and Dick, F.A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div* 7, 10.
- Hernandez-Segura, A., de Jong, T.V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., and Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology* 27, 2652–2660.e4.
- Herranz, N., and Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* 128, 1238–1246.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824–1827.
- Hobbs, G.A., Der, C.J., and Rossman, K.L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J. Cell. Sci.* 129, 1287–1292.
- Holt, L.J. (2012). Regulatory modules: Coupling protein stability to phosphoregulation during cell division. *FEBS Letters* 586, 2773–2777.
- Hsin, J.-P., and Manley, J.L. (2012). The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* 26, 2119–2137.
- Hsu, P.P., Kang, S.A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K.A., Lim, D., Peterson, T.R., Choi, Y., Gray, N.S., Yaffe, M.B., et al. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332, 1317–1322.
- Huisinga, K.L., Brower-Toland, B., and Elgin, S.C.R. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115, 110–122.
- Hung, C.-M., Garcia-Haro, L., Sparks, C.A., and Guertin, D.A. (2012). mTOR-Dependent Cell Survival Mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Hurford, R.K., Cobrinik, D., Lee, M.H., and Dyson, N. (1997). pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev.* 11, 1447–1463.
- International Agency For Research on Cancer. 2020. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>. Consulté le 10 avril 2020.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1161–1165.
- Jimenez, C., Jones, D.R., Rodríguez-Viciano, P., Gonzalez-García, A., Leonardo, E., Wennström, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., R-Borlado, L., Calvo, V., et al. (1998). Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 17, 743–753.
- Jones, D.L., and Münger, K. (1996). Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Seminars in Cancer Biology* 7, 327–337.
- Kamata, T., and Pritchard, C. (2011). Mechanisms of aneuploidy induction by RAS and RAF oncogenes. *Am J Cancer Res* 1, 955–971.

- Kandel, E.S., Skeen, J., Majewski, N., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Feliciano, C.S., Gartel, A., and Hay, N. (2002). Activation of Akt/Protein Kinase B Overcomes a G2/M Cell Cycle Checkpoint Induced by DNA Damage. *Mol Cell Biol* 22, 7831–7841.
- Katayama, K., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2005). Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5725–5737.
- Kim, S., Balakrishnan, S.K., and Gross, D.S. (2011). p53 Interacts with RNA Polymerase II through Its Core Domain and Impairs Pol II Processivity In Vivo. *PLoS One* 6.
- Koepp, D.M. (2014). Cell Cycle Regulation by Protein Degradation. In *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*, E. Noguchi, and M.C. Gadaleta, eds. (New York, NY: Springer), pp. 61–73.
- Koepp, D.M., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97, 431–434.
- Kowald, A., Passos, J.F., and Kirkwood, T.B.L. (2020). On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell* n/a, e13270.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31, 472–483.
- Kroemer, G., Bravo-San Pedro, J.M., and Galluzzi, L. (2015). Novel function of cytoplasmic p53 at the interface between mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Death Dis* 6, e1698.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2008). SnapShot: p53 Posttranslational Modifications. *Cell* 133, 930-30.e1.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell* 137, 609–622.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479.
- Kumar, A., and Carrera, A.C. (2007). New functions for PI3K in the control of cell division. *Cell Cycle* 6, 1696–1698.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009a). mTOR signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* 122, 3589–3594.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009b). mTOR signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* 122, 3589–3594.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Laptenko, O., Shiff, I., Freed-Pastor, W., Zupnick, A., Mattia, M., Freulich, E., Shamir, I., Kadouri, N., Kahan, T., Manfredi, J., et al. (2015). The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Mol. Cell* 57, 1034–1046.
- Lee, S., and Schmitt, C.A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology* 21, 94–101.
- Lele, K.P., Penrose, L.S., and Stallard, H.B. (1963). CHROMOSOME DELETION IN A CASE OF RETINOBLASTOMA. *Ann. Hum. Genet.* 27, 171–174.

- Le monde. (1971). Le président Nixon lance un programme de lutte contre le cancer. https://www.lemonde.fr/archives/article/1971/05/13/le-president-nixon-lance-un-programme-de-lutte-contre-le-cancer_2477288_1819218.html
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9, 749–758.
- Li, Y., Dowbenko, D., and Lasky, L.A. (2002). AKT/PKB Phosphorylation of p21Cip/WAF1 Enhances Protein Stability of p21Cip/WAF1 and Promotes Cell Survival. *J. Biol. Chem.* 277, 11352–11361.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). RAS/MAPK signaling pathway.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–3093.
- Lin, D.I., Barbash, O., Kumar, K.G.S., Weber, J.D., Harper, J.W., Klein-Szanto, A.J.P., Rustgi, A., Fuchs, S.Y., and Diehl, J.A. (2006). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCFFBX4- α Bcrystallin complex. *Mol Cell* 24, 355–366.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.
- Loughery, J., Cox, M., Smith, L.M., and Meek, D.W. (2014). Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res* 42, 7666–7680.
- Lu, F., Portz, B., and Gilmour, D.S. (2019). The C-terminal domain of RNA polymerase II is a multivalent targeting sequence that supports Drosophila development with only consensus heptads. *Mol Cell* 73, 1232-1242.e4.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375, 503–506.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159–161.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391, 601–605.
- Maik-Rachline, G., Hacoheh-Lev-Ran, A., and Seger, R. (2019). Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. *Int J Mol Sci* 20.
- Malgieri, G., Palmieri, M., Russo, L., Fattorusso, R., Pedone, P.V., and Isernia, C. (2015). The prokaryotic zinc-finger: structure, function and comparison with the eukaryotic counterpart. *The FEBS Journal* 282, 4480–4496.
- Malette, F.A., and Ferbeyre, G. (2007a). The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* 6, 1831–1836.
- Malette, F.A., and Ferbeyre, G. (2007b). The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* 6, 1831–1836.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.

- Matthews, H.K., Ganguli, S., Plak, K., Taubenberger, A.V., Win, Z., Williamson, M., Piel, M., Guck, J., and Baum, B. (2020). Oncogenic Signaling Alters Cell Shape and Mechanics to Facilitate Cell Division under Confinement. *Developmental Cell*.
- McClelland, M.L., Gardner, R.D., Kallio, M.J., Daum, J.R., Gorbsky, G.J., Burke, D.J., and Stukenberg, P.T. (2003). The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev* 17, 101–114.
- McKinley, K.L., and Cheeseman, I.M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 16–29.
- Meek, D.W., and Anderson, C.W. (2009). Posttranslational Modification of p53: Cooperative Integrators of Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1.
- Meijer, L. (2003). Le cycle cellulaire et sa régulation.
- Melero, J.A., Stitt, D.T., Mangel, W.F., and Carroll, R.B. (1979). Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93, 466–480.
- Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227–3239.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., and Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66–71.
- Miller, M.E., and Cross, F.R. (2001). Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? *J. Cell. Sci.* 114, 1811–1820.
- Mittnacht, S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 21–27.
- Moll, U.M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res.* 1, 1001–1008.
- Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control* (OUP/New Science Press).
- Muchardt, C., and Yaniv, M. (2001). When the SWI/SNF complex remodels ... the cell cycle. *Oncogene* 20, 3067–3075.
- Mulner-Lorillon, O., Chassé, H., Morales, J., Bellé, R., and Cormier, P. (2017). MAPK/ERK activity is required for the successful progression of mitosis in sea urchin embryos. *Dev. Biol.* 421, 194–203.
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 155, 1104–1118.
- MV Blagosklonny, and Pardee, A. (2013). *The Restriction Point of the Cell Cycle - Madame Curie Bioscience Database - NCBI Bookshelf*.
- Nakamura, A.J., Chiang, Y.J., Hathcock, K.S., Horikawa, I., Sedelnikova, O.A., Hodes, R.J., and Bonner, W.M. (2008). Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 1, 6.
- Nalepa, G., and Clapp, D.W. (2018). Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nat. Rev. Cancer* 18, 168–185.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.

- Nevins, J.R. (1998). Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 9, 585–593.
- Ohama, T. (2019). The multiple functions of protein phosphatase 6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866, 74–82.
- Ohtani, K., DeGregori, J., and Nevins, J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12146–12150.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat. Cell Biol.* 4, 111–116.
- O'Reilly, J.-A., Fitzgerald, J., Fitzgerald, S., Kenny, D., Kay, E.W., O'Kennedy, R., and Kijanka, G.S. (2015). Diagnostic Potential of Zinc Finger Protein-Specific Autoantibodies and Associated Linear B-Cell Epitopes in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 10.
- Palmer, A., Gavin, A.C., and Nebreda, A.R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J* 17, 5037–5047.
- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1286–1290.
- Pardee, A.B., Li, C.J., and Reddy, G.P.V. (2004). Regulation in S phase by E2F. *Cell Cycle* 3, 1091–1094.
- Perri, F., Pisconti, S., and Della Vittoria Scarpati, G. (2016). P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Ann Transl Med* 4.
- te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62, 1876–1883.
- Qian, Y., and Chen, X. (2010). Tumor suppression by p53: making cells senescent. *Histol Histopathol* 25, 515–526.
- Rahner, N., and Steinke, V. (2008). Hereditary Cancer Syndromes. *Dtsch Arztebl Int* 105, 706–714.
- Raj, N., and Attardi, L.D. (2017). The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7.
- Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.-S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 15, 398–403.
- Reisman, D., Glaros, S., and Thompson, E.A. (2009). The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28, 1653–1668.
- Reyes, J., Chen, J.-Y., Stewart-Ornstein, J., Karhohs, K.W., Mock, C.S., and Lahav, G. (2018). Fluctuations in p53 Signaling Allow Escape from Cell-Cycle Arrest. *Mol. Cell* 71, 581–591.e5.
- Rhinn, M., Ritschka, B., and Keyes, W.M. (2019). Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development* 146.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes Cancer* 2, 466–474.
- Rizkallah, R., Alexander, K.E., and Hurt, M.M. (2011). Global mitotic phosphorylation of C2H2 zinc finger protein linker peptides. *Cell Cycle* 10, 3327–3336.

- Roberts, R.M., Green, J.A., and Schulz, L.C. (2016). The Evolution of the Placenta. *Reproduction* 152, R179–R189.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* 25, 338–342.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192, 547–556.
- Rohrmoser, M., Kluge, M., Yahia, Y., Gruber-Eber, A., Maqbool, M.A., Forné, I., Krebs, S., Blum, H., Greifenberg, A.K., Geyer, M., et al. (2019). MIR sequences recruit zinc finger protein ZNF768 to expressed genes. *Nucleic Acids Res* 47, 700–715.
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadoy, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghafinia, S., et al. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173, 321-337.e10.
- Saryeddine, L., Zibara, K., Kassem, N., Badran, B., and El-Zein, N. (2016). EGF-Induced VEGF Exerts a PI3K-Dependent Positive Feedback on ERK and AKT through VEGFR2 in Hematological In Vitro Models. *PLoS ONE* 11, e0165876.
- Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129–1136.
- Scudellari, M. (2017). To stay young, kill zombie cells. *Nature* 550, 448–450.
- Setton, J.S., and Powell, S.N. (2018). A new role for a tumor-suppressing protein. *Elife* 7.
- Shaltiel, I.A., Aprelia, M., Saurin, A.T., Chowdhury, D., Kops, G.J.P.L., Voest, E.E., and Medema, R.H. (2014). Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 7313–7318.
- Shen, T., and Huang, S. (2012). The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem* 12, 631–639.
- Sherr, C.J. (2012). Ink4-Arf Locus in Cancer and Aging. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 731–741.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* 8, 1145–1152.
- Smith, A.E., Smith, R., and Paucha, E. (1979). Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 18, 335–346.
- Société Canadienne du Cancer, 2020. Vue d'ensemble des statistiques sur le cancer. <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/cancer-statistics-at-a-glance/?region=qc>. Consulté le 10 décembre 2020.
- Speidel, D. (2010). Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20, 14–24.
- Stanley, E.R., Guilbert, L.J., Tushinski, R.J., and Bartelmez, S.H. (1983). CSF-1--a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J. Cell. Biochem.* 21, 151–159.

- Sullivan, K.D., Galbraith, M.D., Andrysiak, Z., and Espinosa, J.M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death and Differentiation* 25, 133–143.
- Surmacz, E., Reiss, K., Sell, C., and Baserga, R. (1992). Cyclin D1 messenger RNA is inducible by platelet-derived growth factor in cultured fibroblasts. *Cancer Res.* 52, 4522–4525.
- Tan, E.M., and Zhang, J. (2008). Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol Rev* 222, 328–340.
- Tan, P., Wang, Y.-J., Li, S., Wang, Y., He, J.-Y., Chen, Y.-Y., Deng, H.-Q., Huang, W., Zhan, J.-K., and Liu, Y.-S. (2016). The PI3K/Akt/mTOR pathway regulates the replicative senescence of human VSMCs. *Mol. Cell. Biochem.* 422, 1–10.
- Tu, Z., Aird, K.M., Bitler, B.G., Nicodemus, J.P., Beeharry, N., Xia, B., Yen, T.J., and Zhang, R. (2011). Oncogenic RAS regulates BRIP1 expression to induce dissociation of BRCA1 from chromatin, inhibit DNA repair, and promote senescence. *Dev. Cell* 21, 1077–1091.
- Tu, Z., Aird, K.M., and Zhang, R. (2013). Chromatin remodeling, BRCA1, SAHF and cellular senescence. *Cell Cycle* 12, 1653–1654.
- Uchida, C. (2016). Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *Biomed Res Int* 2016.
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., and Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 195–203.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.
- Vassilev, L.T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D.C., and Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *PNAS* 103, 10660–10665.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.
- Vodermaier, H.C. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr. Biol.* 14, R787-796.
- Walter, E., and Scott, M. (2017). The life and work of Rudolf Virchow 1821–1902: “Cell theory, thrombosis and the sausage duel.” *J Intensive Care Soc* 18, 234–235.
- Watanabe, Y. (2005). Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 590–595.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* 118, 843–846.
- Wianny, F., Real, F.X., Mummery, C.L., Van Rooijen, M., Lahti, J., Samarut, J., and Savatier, P. (1998). G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev. Dyn.* 212, 49–62.
- Winston, J.T., and Pledger, W.J. (1993). Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Biol. Cell* 4, 1133–1144.
- Wolf, D., and Rotter, V. (1985). Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 790–794.

- Yan, Z., DeGregori, J., Shohet, R., Leone, G., Stillman, B., Nevins, J.R., and Williams, R.S. (1998). Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3603–3608.
- Yang, L., Fang, J., and Chen, J. (2017). Tumor cell senescence response produces aggressive variants. *Cell Death Discov* 3, 17049.
- Yoon, M.-H., Kang, S.-M., Lee, S.-J., Woo, T.-G., Oh, A.-Y., Park, S., Ha, N.-C., and Park, B.-J. (2019). p53 induces senescence through Lamin A/C stabilization-mediated nuclear deformation. *Cell Death Dis* 10, 107.
- Yu, K.-W., Zhong, N., Xiao, Y., and She, Z.-Y. (2019). Mechanisms of kinesin-7 CENP-E in kinetochore-microtubule capture and chromosome alignment during cell division. *Biol. Cell* 111, 143–160.
- Yunis, J.J., and Ramsay, N. (1978). Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J. Dis. Child.* 132, 161–163.
- Zaborowska, J., Egloff, S., and Murphy, S. (2016). The pol II CTD: new twists in the tail. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 771–777.
- Zecevic, M., Catling, A.D., Eblen, S.T., Renzi, L., Hittle, J.C., Yen, T.J., Gorbsky, G.J., and Weber, M.J. (1998). Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J. Cell Biol.* 142, 1547–1558.
- Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79–89.
- Zhang, Q., Sakamoto, K., and Wagner, K.-U. (2014). D-type Cyclins are important downstream effectors of cytokine signaling that regulate the proliferation of normal and neoplastic mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 382.
- Zhao, X., Wei, C., Li, J., Xing, P., Li, J., Zheng, S., and Chen, X. (2017). Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 49, 655–668.
- Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., et al. (2011). Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 10, 1411–1419.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 245–252.